

**SÍLVIA MARIA PIRES GARCIA**

**BIOCATÁLISE EM MEIOS NÃO CONVENCIONAIS:  
SOLVENTES ORGÂNICOS, FLUIDOS SUPERCRÍTICOS E  
LÍQUIDOS IÓNICOS**

**LISBOA**

**2005**



N.º de arquivo:

“copyright”:



**SÍLVIA MARIA PIRES GARCIA**

**BIOCATÁLISE EM MEIOS NÃO CONVENCIONAIS:  
SOLVENTES ORGÂNICOS, FLUIDOS SUPERCRÍTICOS E  
LÍQUIDOS IÓNICOS**

Dissertação apresentada para obtenção do Grau de Doutor  
em Bioquímica, especialidade em Biotecnologia, pela  
Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e  
Tecnologia

**LISBOA**

**2005**



A meus Pais, Irmãos,  
Marido e, especialmente,  
ao meu filho, Bruno.





## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora, Professora Susana Barreiros, agradeço, não apenas toda a sua disponibilidade, elevada competência científica e mestria com que assistiu o meu trabalho, mas também a amizade e confiança demonstrada ao longo destes anos.

À Eng.<sup>a</sup> Conceição Almeida, minha querida amiga São, que para além das suas qualidades profissionais, me proporcionou, todo o seu apoio, amizade, companheirismo e boa disposição. À Eng.<sup>a</sup> Célia Peres, companheira de longa data, e Dr.<sup>a</sup> M.<sup>a</sup> João Amorim, duas colegas e, acima de tudo amigas, que apesar de em muito diferentes, contribuíram de uma forma determinante, com o seu o saber, amizade e disponibilidade para ultrapassar as dificuldades encontradas.

Ao Eng.<sup>o</sup> Pedro Vidinha, que interveio directamente nos trabalhos presentes nesta dissertação, pela sua amizade e sua profícua colaboração no desenvolvimentos dos mesmos. À Eng.<sup>a</sup> Helena Harvana, pela sua amizade e capacidade de trabalho, que se revelou uma preciosa ajuda no trabalho laboratorial. Ao Dr. Nuno Fontes, pela sua amizade, disponibilidade e transmissão de conhecimentos. Ao Dr. Neil Harper pela sua disponibilidade e contributo científico, fundamentais na análise e consolidação dos resultados obtidos. Às colegas Vera Augusto, Diana Lousa, Ana Sequeira e Paula Mimoso pelo contributo no trabalho experimental.

Ao Professor Carlos Afonso e Nuno Lourenço, pela disponibilidade e colaboração trabalhos desenvolvidos com os líquidos iónicos, essenciais para a consecução do presente trabalho. À Professora Eugénia Macedo, Dr.<sup>a</sup> Olga Ferreira e Eng.<sup>o</sup> Adriano Ribeiro, pela contribuição no que respeita às análises termodinâmicas, que consubstanciaram e complementaram as conclusões alcançadas. Ao Professor Cláudio Soares e Nuno Micaelo pelos trabalhos de modelação, que em muito contribuíram para um maior aprofundamento dos resultados adquiridos. Ao Professor Marco Gomes da Silva pela disponibilidade demonstrada na resolução de problemas relacionados com a parte analítica por GC e pelo empréstimo da coluna que proporcionou este tipo de análise.

À D. Maria José, Eng.<sup>a</sup> Lúcia e Isabel por solucionarem os problema burocráticos, e ao Sr. Luís Leandro e Sr. Louro pela resolução do problemas técnicos.

À fundação para a Ciência e Tecnologia pelo apoio financeiro que tornou possível a realização deste trabalho.

Aos meus Pais e irmãos por toda sua dedicação e apoio prestado. Em especial, à minha Mãe, a quem muito devo todas conquistas por mim alcançadas, por toda a sua devoção e amor e, principalmente, pelo seu inestimável auxílio na educação e criação do meu filho. Ao meu filho e marido, os alicerces da minha vida, por tão simplesmente existirem.

E a todos aqueles que de algum modo contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos, muito obrigada.

## RESUMO

Realizou-se um estudo comparativo da actividade da enzima cutinase de *Fusarium solani pisi* immobilizada nos zeólitos NaA e NaY, em *n*-hexano, acetonitrilo, etano supercrítico (etano-sc) e dióxido de carbono supercrítico (CO<sub>2</sub>-sc), a duas actividades da água diferentes ( $a_w$ ) fixadas com pares de sais hidratados *in situ*, e em condições ácido-base fixadas com tampões sólidos possuindo valores de pK<sub>a</sub> em meio aquoso entre 4,3 e 10. A reacção estudada foi a transesterificação do butirato de vinilo pelo (*R,S*)-2-fenil-1-propanol.

A actividade da cutinase para a transesterificação foi mais elevada e semelhante em etano-sc e *n*-hexano, cerca de uma ordem de grandeza mais baixa em acetonitrilo e ainda mais reduzida em CO<sub>2</sub>-sc. Os coeficientes de actividade ( $\gamma$ ) calculados para os dois substratos indicam que os mesmos estão mais bem solvatados em acetonitrilo e por isso menos disponíveis para se ligarem ao centro activo da enzima do que nos outros três solventes. Os valores de  $\gamma$  sugerem ainda velocidades de reacção mais elevadas em etano-sc do que em *n*-hexano, conforme se observou experimentalmente, e evidenciam um efeito negativo directo do CO<sub>2</sub>-sc na actividade da enzima.

A manipulação das condições ácido-base do meio não permitiu melhorar as velocidades iniciais de transesterificação relativamente aos brancos (ausência de tampão ácido-base, adição apenas do par de sais hidratados), excepto no caso da cutinase immobilizada no zeólito NaA e em etano-sc, a  $a_w = 0,7$ . O mau resultado para o branco neste caso e o grande melhoramento observado na presença de um tampão básico sugerem a existência de um efeito negativo de acidez do meio que, através da realização de uma experiência sem aditivos, se confirmou não ser devido ao reconhecido carácter acídico do par de sais hidratados utilizado para fixar  $a_w = 0,7$ .

Em acetonitrilo, o aumento de  $a_w$  foi acompanhado por uma diminuição das velocidades iniciais de transesterificação, ao contrário do que se observou nos outros solventes. Registou-se uma hidrólise considerável em acetonitrilo, solvente no qual as velocidades iniciais de hidrólise aumentaram cerca de 20 vezes quando se passou de  $a_w = 0,2$  para  $a_w = 0,7$ . A hidrólise foi menos pronunciada em etano-sc e em *n*-hexano, e foi apenas

observada a  $a_w = 0,7$ . Em CO<sub>2</sub>-sc, só se detectou ácido butírico após tempos de reacção muito longos, o que está de acordo com uma actividade catalítica genericamente baixa neste solvente.

Mediram-se ainda as actividades catalíticas da cutinase imobilizada no zeólito NaY na mesma reacção modelo de transesterificação em três líquidos iónicos (LIs) contendo como catião o ião imidazólio, a  $a_w = 0,2$  e  $0,7$ . Para comparação, mediram-se também as actividades catalíticas da lipase B de *Candida antarctica* imobilizada numa resina acrílica (Novozym 435) nos mesmos LIs, em etano-sc, em CO<sub>2</sub>-sc e em *n*-hexano.

A actividade de transesterificação da cutinase foi mais elevada e semelhante em 1-*n*-butil-3-metilimidazólio hexafluorofosfato ([C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>]), etano-sc e *n*-hexano, e aumentou com o aumento de  $a_w$ . Em LIs, observou-se hidrólise apenas a  $a_w = 0,7$ .

Quer as velocidades iniciais de transesterificação, quer de hidrólise da Novozym diminuíram com o aumento de  $a_w$ . O CO<sub>2</sub>-sc não teve um efeito negativo na actividade desta enzima que foi tão elevada em CO<sub>2</sub>-sc quanto em etano-sc e em *n*-hexano. As velocidades de reacção baixas registadas neste caso nos LIs sugerem a existência de limitações difusionais internas que não se verificam no caso da preparação de cutinase, na qual a enzima se encontra adsorvida apenas à superfície do suporte.

O CO<sub>2</sub>-sc não afectou de forma negativa a actividade catalítica da cutinase suspensa em [C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>], o que sugere um efeito protector do LI. No caso da Novozym, obteve-se um aumento acentuado da velocidade de transesterificação no sistema [C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>]/CO<sub>2</sub>-sc, relativamente ao [C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>] sozinho. Este facto pode reflectir um melhoramento da transferência de massa dos solutos para os poros da matriz de imobilização, devido à elevada concentração de CO<sub>2</sub> dissolvido e à redução da viscosidade do LI.

À temperatura de 35 °C, tinha-se verificado que a enantioselectividade (E) da cutinase relativamente ao (*R,S*)-2-fenil-1-propanol era baixa e não era afectada por qualquer manipulação das condições do meio. Este estudo foi complementado com outro sobre a influência da temperatura (T) e do solvente em E, a valores de T iguais ou inferiores a 0 °C.

Para o efeito, começou por se medir a actividade catalítica da cutinase imobilizada à superfície do zeólito NaY na transesterificação do butirato de vinilo com o 2-fenil-1-propanol em *n*-hexano, a temperaturas entre  $-18$  e  $35$  °C e valores de  $a_w$  fixados à temperatura ambiente. Para comparação, mediu-se também a actividade catalítica da lipase B de *Candida antarctica* (CALB) imobilizada (Novozym 435).

A  $0$  e  $-18$  °C, a cutinase exibiu em *n*-hexano cerca de 50 e 20 % da actividade exibida a  $35$  °C, respectivamente, valores que desceram para cerca de 30 e 10 % no caso da CALB. O cálculo dos coeficientes de difusão a diluição infinita dos dois substratos em *n*-hexano sugeriu que aquelas variações de actividade não deverão reflectir quaisquer limitações difusionais externas. A diminuição de  $T$  não afectou substancialmente a razão das velocidades de transesterificação e de hidrólise para as duas enzimas.

A enantioselectividade da cutinase foi medida em *n*-hexano, em acetonitrilo e em  $[C_4mim][PF_6]$ . O valor de  $E$  praticamente duplicou quando  $T$  desceu de  $35$  para  $0$  °C, mas manteve-se constante ( $E \approx 4,6$ ) com uma diminuição adicional de  $T$  até  $-25$  °C. O valor de  $E$  obtido em *n*-hexano para valores de  $T$  iguais ou inferiores a  $0$  °C foi idêntico ao obtido em  $[C_4mim][PF_6]$  a  $-18$  °C, apesar da provável existência de limitações difusionais externas devido à elevada viscosidade deste solvente. Ainda, a informação existente sobre o equilíbrio de fases nos sistemas binários formados por cada um daqueles solventes com a água sugere que terá havido separação de fases às temperaturas de trabalho mais baixas. Em acetonitrilo,  $E$  da cutinase não variou com  $T$ , e o mesmo se observou para a CALB. No entanto, em *n*-hexano,  $E$  da CALB teve uma variação com a temperatura que conduziu a uma relação linear de  $\ln E$  com o inverso de  $T$ , como esperado ( $E$  aumentou cerca de 5 vezes entre  $35$  e  $-25$  °C).



## ABSTRACT

We performed a comparative study on the activity of *Fusarium solani pisi* cutinase immobilized on zeolites NaA and NaY, in *n*-hexane, acetonitrile, supercritical ethane (sc-ethane) and sc-CO<sub>2</sub>, at two different water activity ( $a_w$ ) values set by salt hydrate pairs *in-situ* and at acid-base conditions fixed with solid-state buffers of aqueous pK<sub>a</sub> between 4,3 and 10,6. The reaction studied was the transesterification of vinyl butyrate by (*R,S*)-2-phenyl-1-propanol.

The transesterification activity of cutinase was highest and similar in sc-ethane and in *n*-hexane, about one order of magnitude lower in acetonitrile and even lower in sc-CO<sub>2</sub>. Activity coefficients ( $\gamma$ ) generated for the two substrates indicated that they were better solvated in acetonitrile and thus less available for binding at the active site than in the other three solvents.  $\gamma$  data also suggested higher reaction rates in sc-ethane than in *n*-hexane, as observed, and provided evidence for a direct negative effect of sc-CO<sub>2</sub> on enzyme activity.

Manipulation of the acid-base conditions of the media did not afford any improvement of the initial rates of transesterification relative to the blanks (no added acid-base buffer, only salt hydrate pair), except in the case of cutinase immobilized on zeolite NaA in sc-ethane at  $a_w = 0,7$ . The poor performance of the blank in this case and the great improvement observed in the presence of a basic buffer suggest a deleterious acidic effect in the medium, which an experiment without additives confirmed was not due to the known acidic character of the salt hydrate pair used to set  $a_w = 0,7$ .

In acetonitrile, increasing  $a_w$  was accompanied by a decrease in initial rates of transesterification, unlike in the other solvents. There was considerable hydrolysis in acetonitrile, where initial rates of hydrolysis increased about 20-fold from  $a_w = 0,2$  to  $a_w = 0,7$ . Hydrolysis was less pronounced in sc-ethane and in *n*-hexane, and only at  $a_w = 0,7$ , and in sc-CO<sub>2</sub> butyric acid was detected only at very long reaction times, in agreement with a generally low catalytic activity.

We also measured the catalytic activities of cutinase immobilized on zeolite NaY in the same model transesterification reaction in three imidazolium cation-based ionic liquids (RTILs), at  $a_w = 0,2$  and  $0,7$ . For comparison, the catalytic activities of *Candida antarctica*

lipase B immobilized on an acrylic resin (Novozym 453) were measured in the same RTILs, in sc-ethane, in sc-CO<sub>2</sub> and in *n*-hexane.

The transesterification activity of cutinase was highest and similar in 1-*n*-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ([C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>]), sc-ethane and *n*-hexane, and increased with an increase in *a<sub>w</sub>*. In RTILs, hydrolysis was detected at *a<sub>w</sub>* = 0,7 only.

Both initial rates of transesterification and of hydrolysis of Novozym decreased with an increase in *a<sub>w</sub>*. Sc-CO<sub>2</sub> did not have a deleterious effect on Novozym activity, which was as high as in sc-ethane and *n*-hexane. The low reaction rates obtained in this case in RTILs suggested the existence of internal diffusion limitations absent in the cutinase preparation where the enzyme is only adsorbed at the surface of the support.

Sc-CO<sub>2</sub> did not adversely affect the catalytic activity of cutinase suspended in [C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>], suggesting a protective effect of the RTIL. In the case of Novozym, a marked increase in the rate of transesterification was obtained in the [C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>]/sc-CO<sub>2</sub> system, compared to the RTIL alone. This may reflect improved mass transfer of solutes to the pores of the immobilization matrix due to a high concentration of dissolved CO<sub>2</sub> and a reduction in viscosity of the RTIL.

At 35 °C, we had found that the enantioselectivity (*E*) of cutinase towards (*R,S*)-2-phenyl-1-propanol was low and unaffected by any manipulation of medium conditions. This study was complemented by another on the influence of temperature (*T*) and solvent on *E*, at *T* values equal to or below 0 °C.

We first measured the catalytic activity of cutinase immobilized at the surface of zeolite NaY in the transesterification of vinyl butyrate by 2-phenyl-1-propanol in *n*-hexane, at temperatures between –18 and 35 °C and *a<sub>w</sub>* values fixed at room temperature. For comparison, the catalytic activity of immobilized *Candida antarctica* lipase B (Novozym 453; immobilized CALB) was also measured.

At 0 and –18 °C, cutinase exhibited in *n*-hexane approximately 50 and 20 % of its activity at 35 °C, respectively, values that went down to 30 and 10 % for CALB. Diffusion coefficients at infinite dilution calculated for the two substrates in *n*-hexane suggested that those changes in activity should not reflect any external diffusion limitations. The ratio of



the rates of transesterification and hydrolysis for the two enzymes was not significantly affected by the lowering of T.

The enantioselectivity of cutinase was measured in *n*-hexane, in acetonitrile and in [C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>]. The value of E practically doubled when T was lowered from 35 to 0 °C, but remained constant ( $E \approx 4,6$ ) when T was further lowered to -25 °C. The value of E obtained in *n*-hexane at T values equal to or below 0 °C was the same as that obtained in [C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>] at -18 °C, although the high viscosity of the latter solvent makes it likely that there were external diffusion limitations in that case. Also the information available on phase equilibria for the binary systems formed by each of those solvents with water suggests that a phase separation occurred at the lower working temperatures. In acetonitrile, E for cutinase did not vary with T, and the same behavior was observed with CALB. However, in *n*-hexane E for CALB responded to changes in T that led to a linear relationship between  $\ln E$  and the inverse of T, as expected (E increased approximately 5 times between 35 and -25 °C).



## NOMENCLATURA

$a_i$  – Actividade de uma espécie  $i$  genérica.

$a_w$  – Actividade da água .

**BSNA** – Biocatálise em solventes não aquosos

**CO<sub>2</sub>** – Dióxido de carbono.

**E** – Razão enantiomérica, também designada apenas por enantioselectividade.

**e.e.** – Excesso enantiomérico.

**Fluido-sc** – Fluido supercrítico.

$\Delta\Delta G^\#$  – Diferença entre as energias de Gibbs de activação para os dois enantiómeros.

**GC** – Cromatografia gasosa .

$\Delta\Delta H^\#$  – Diferença entre as entalpias de activação para os dois enantiómeros.

**K<sub>m</sub>** – Constante de Michaelis–Menten para a dissociação.

**LI** – Líquido iónico (*room-temperature ionic liquid*).

**P<sub>c</sub>** – Pressão crítica.

$\Delta\Delta S^\#$  – Diferença entre as entropias de activação para os dois enantiómeros.

**T** – Temperatura.

**T<sub>c</sub>** – Temperatura crítica.

**T<sub>inv</sub>** – Temperatura de inversão.

**T<sub>r</sub>** – Temperatura racémica.

**V<sub>i</sub>** – Velocidade inicial.

$x_i$  – fracção molar da espécie  $i$ .

$\gamma_i$  – Coeficiente de actividade da espécie  $i$  na convenção simétrica (i.e.  $a_i = x_i \gamma_i$ ).



## ÍNDICE GERAL

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO GERAL E OBJECTIVOS</b>   | <b>3</b>  |
| <b>2</b> | <b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>   | <b>9</b>  |
| 2.1      | BIOCATÁLISE EM SOLVENTES NÃO AQUOSOS (BSNA)  | 9         |
| 2.2      | PARÂMETROS CRÍTICOS NA BSNA  | 11        |
| 2.2.1    | Água   | 11        |
| 2.2.2    | Estado de ionização – efeitos ácido base   | 13        |
| 2.2.3    | Solvente   | 15        |
| 2.2.4    | Suporte enzimático   | 16        |
| 2.2.5    | Baixa temperatura  | 19        |
| 2.3      | BIOCATÁLISE EM FLUIDOS SUPERCRÍTICOS   | 20        |
| 2.4      | BIOCATÁLISE EM LÍQUIDOS IÓNICOS  | 23        |
| 2.5      | BIOCATÁLISE EM LÍQUIDOS IÓNICOS/CO <sub>2</sub> -SC  | 24        |
| 2.6      | LIPASES E ESTERASES DE SERINA  | 25        |
| 2.6.1    | Cutinase de <i>Fusarium Solani Pisi</i>  | 27        |
| 2.6.2    | Lipase B de <i>Candida antarctica</i> (CALB)   | 29        |
| 2.6.3    | Mecanismo reaccional das lipases e das esterases de serina   | 30        |
| 2.7      | ENGENHARIA DE PROTEÍNAS E OUTRAS ABORDAGENS  | 33        |
| <b>3</b> | <b>ACTIVIDADE DA CUTINASE EM MEIOS SUPERCRÍTICOS E<br/>ORGÂNICOS: EFEITOS DA ACTIVIDADE DA ÁGUA E DA SOLVATAÇÃO E<br/>EFEITOS ÁCIDO-BASE</b> | <b>37</b> |
| 3.1      | RESUMO   | 37        |
| 3.2      | INTRODUÇÃO   | 38        |
| 3.3      | MATERIAIS E MÉTODOS  | 41        |
| 3.3.1    | Materiais  | 41        |
| 3.3.2    | Imobilização da enzima   | 42        |
| 3.3.3    | Ensaio enzimáticos   | 42        |
| 3.3.4    | Métodos de análise   | 43        |
| 3.3.5    | Coeficientes de actividade   | 44        |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 3.4      | RESULTADOS E DISCUSSÃO .....   | 44        |
| 3.5      | CONCLUSÃO .....  | 52        |
| <b>4</b> | <b>ESTUDO COMPARATIVO DE BIOCATÁLISE EM SOLVENTES NÃO-CONVENCIONAIS: LÍQUIDOS IÔNICOS, FLUIDOS SUPERCRÍTICOS E MEIO ORGÂNICO .....</b> | <b>57</b> |
| 4.1      | RESUMO .....   | 57        |
| 4.2      | INTRODUÇÃO .....   | 58        |
| 4.3      | MATERIAIS E MÉTODOS .....  | 60        |
| 4.3.1    | <i>Materiais</i> .....   | 60        |
| 4.3.2    | <i>Imobilização da cutinase</i> .....  | 60        |
| 4.3.3    | <i>Ensaio enzimático em Batch</i> .....  | 61        |
| 4.3.4    | <i>Reacções em reactor continuo</i> .....  | 62        |
| 4.3.5    | <i>Métodos de análise</i> .....  | 62        |
| 4.4      | RESULTADOS E DISCUSSÃO .....   | 63        |
| 4.5      | CONCLUSÃO .....  | 70        |
| <b>5</b> | <b>ACTIVIDADE E ENANTIOSELECTIVIDADE DA CUTINASE A BAIXA TEMPERATURA EM MEIOS NÃO-CONVENCIONAIS .....</b>                              | <b>73</b> |
| 5.1      | RESUMO .....   | 73        |
| 5.2      | INTRODUÇÃO .....   | 74        |
| 5.3      | MATERIAIS E MÉTODOS .....  | 76        |
| 5.3.1    | <i>Materiais</i> .....   | 76        |
| 5.3.2    | <i>Imobilização da cutinase no zeólito NaY</i> .....   | 77        |
| 5.3.3    | <i>Ensaio enzimático</i> .....   | 77        |
| 5.3.4    | <i>Métodos de análise</i> .....  | 78        |
| 5.4      | RESULTADOS E DISCUSSÃO .....   | 79        |
| 5.5      | CONCLUSÃO .....  | 85        |
| <b>6</b> | <b>CONCLUSÃO GERAL .....</b>   | <b>89</b> |
| <b>7</b> | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>  | <b>97</b> |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <i>Fig. 1.1 Reacção alvo: Transesterificação do butirato de vinilo com o 2-fenil-1-propanol.</i>   | 4  |
| <i>Fig. 1.2 Reacção secundária: hidrólise do butirato de vinilo.</i>   | 4  |
| <i>Fig. 2.1 Estruturas dos catiões mais comuns em LIs. (a) tetralquilamónio. (b) tetralquilfosfónio. (c) 1,3-dialquilimidazólio. (d) alquilpiridínio.</i>  | 23 |
| <i>Fig. 2.2 Estrutura da cutinase, destacando a tríade catalítica [Carvalho et al., 1999]</i>  | 28 |
| <i>Fig. 2.3 Estrutura da CALB, destacando a tríade catalítica.</i>   | 29 |
| <i>Fig. 2.4 Mecanismo ping-pong bi-bi aplicado à transesterificação do butirato de vinilo com o 2-fenil-1-propanol e à reacção secundária de hidrólise do éster substrato.</i>   | 32 |
| <i>Fig. 3.1 Efeito dos tampões ácido-base sólidos e de <math>aW</math> nas velocidades iniciais de transesterificação da cutinase imobilizada no zeólito NaY, em fluidos-sc e solventes orgânicos. O eixo esquerdo dos yy refere-se ao etano-sc e ao n-hexano (dados do lado esquerdo da linha a tracejado). <math>pK_a</math> em meio aquoso dos tampões (25°C): 10,3 (<math>Na_2CO_3/NaHCO_3</math>), 9,6 (CAPSO/CAPSO·Na), 7,2 (MOPS/MOPS·Na), 4,3 (GLU/GLU·Na). <math>T = 35\text{ }^\circ\text{C}</math>. <math>P = 100\text{ bar}</math> (fluidos-sc). <math>[2\text{-fenil-1-propanol}] = 25\text{ mM}</math>. <math>[\text{butirato de vinilo}] = 170\text{ mM}</math>. <math>[\text{preparação enzimática}]</math>: 1 g L<sup>-1</sup> ou 4 g L<sup>-1</sup> (CO<sub>2</sub>-sc).</i> | 45 |
| <i>Fig. 3.2 Efeito dos tampões ácido-base sólidos e de <math>aW</math> nas velocidades iniciais de transesterificação da cutinase imobilizada no zeólito NaA, em fluidos-sc e solventes orgânicos. O eixo esquerdo dos yy refere-se ao etano-sc e ao n-hexano (dados do lado esquerdo da linha a tracejado).</i>   | 46 |
| <i>Fig. 3.3 Velocidades iniciais da hidrólise em fluidos-sc e em solventes orgânicos. O eixo do yy esquerdo foi usado para o etano-sc e n-hexano (dados do lado esquerdo da linha a tracejado).</i>  | 48 |
| <i>Fig. 4.1 Montagem utilizada nos ensaios efectuados em contínuo. P1, P2 = bombas de HPLC. B1, B2, B3 = banhos termostáticos. S1, S2 = amostragem. sb = barra de agitação.</i>  | 62 |
| <i>Fig. 4.2 Concentração da água em LI a <math>aW = 0,2</math> (barras brancas), <math>aW = 0,7</math> (barras cinzento claro), e na saturação (barra cinzento escuro), a <math>T = 25\text{ }^\circ\text{C}</math>.</i>   | 64 |

- Fig. 4.3 Velocidades iniciais de transesterificação para a cutinase imobilizada no zeólito NaY em LIs, fluidos-sc e n-hexano, a  $aW = 0,2$  e  $aW = 0,7$ . O código para as barras é o mesmo da Fig. 4.2  $T = 35\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $P = 100\text{ bar}$  (fluidos-sc). [2-fenil-1-propanol] = 60 mM. [butirado de vinilo] = 170 mM. [cutinase imobilizada] = 6 g L<sup>-1</sup> (LIs), 1 g L<sup>-1</sup> (etano-sc e n-hexano), 4 g L<sup>-1</sup> (CO<sub>2</sub>-sc). As velocidades são dadas por mg de preparação de enzima imobilizada. .... 64
- Fig. 4.4. Velocidades iniciais de hidrólise para a cutinase imobilizada no zeólito NaY em LIs a  $aW = 0,7$ . As condições reacionais são as mesmas da Fig. 4.3. .... 66
- Fig. 4.5 Velocidades iniciais de transesterificação para a Novozym em LI, fluidos-sc e n-hexano, a  $aW = 0,2$  e  $aW = 0,7$  (não se recolheram dados a  $aW = 0,7$  em fluidos-sc). [Novozym] = 2 g L<sup>-1</sup> ou 4 g L<sup>-1</sup> (LI). As restantes condições reacionais são as indicadas na Fig. 4.3. As velocidades são dadas por mg de Novozym. .... 66
- Fig. 4.6 Velocidades iniciais de hidrólise para a Novozym em LIs, fluidos-sc e n-hexano a  $aW = 0,2$  e  $aW = 0,7$  (não se recolheram dados a  $aW = 0,7$  em fluidos-sc). Condições reacionais iguais às da Fig. 4.5. .... 68
- Fig. 5.1 Efeito da temperatura nas velocidades iniciais de transesterificação (barras com rebordo fino) e de hidrólise (barras com rebordo grosso) para a cutinase imobilizada no zeólito NaY (barras cinzentas) e para a Novozym (barras brancas), em n-hexano. Não se detectou hidrólise com a cutinase a 35 °C. Todos os componentes da mistura reaccional foram pré-equilibrados a  $aW = 0,7$ , à temperatura ambiente. [2-fenil-1-propanol] = 100 mM. [butirado de vinilo] = 300 mM. As velocidades iniciais são dadas por mg de proteína (cutinase) ou por mg de preparação enzimática (Novozym). .... 80



## ÍNDICE DE TABELAS

|  |           |
|--|-----------|
| <i>Tabela 2.1 Temperatura e pressão críticas das algumas substâncias utilizadas como fluidos-sc em biocatálise.....</i>        | <i>22</i> |
| <i>Tabela 3.1 Coeficientes de actividade a diluição infinita calculados para as misturas binárias (soluto + solvente).....</i> | <i>49</i> |
| <i>Tabela 3.2 Coeficientes de actividade calculados para as misturas quaternárias a <math>a_w = 0,7</math>. ....</i>           | <i>51</i> |
| <i>Tabela 5.1 Efeito da temperatura nos coeficientes de difusão dos dois substratos a diluição infinita, em n-hexano. ....</i> | <i>82</i> |
| <i>Tabela 5.2 Efeito da temperatura e do solvente na enantioselectividade da cutinase e da CALB.....</i>                       | <i>84</i> |



# **CAPÍTULO 1**

## **Introdução Geral e Objectivos**



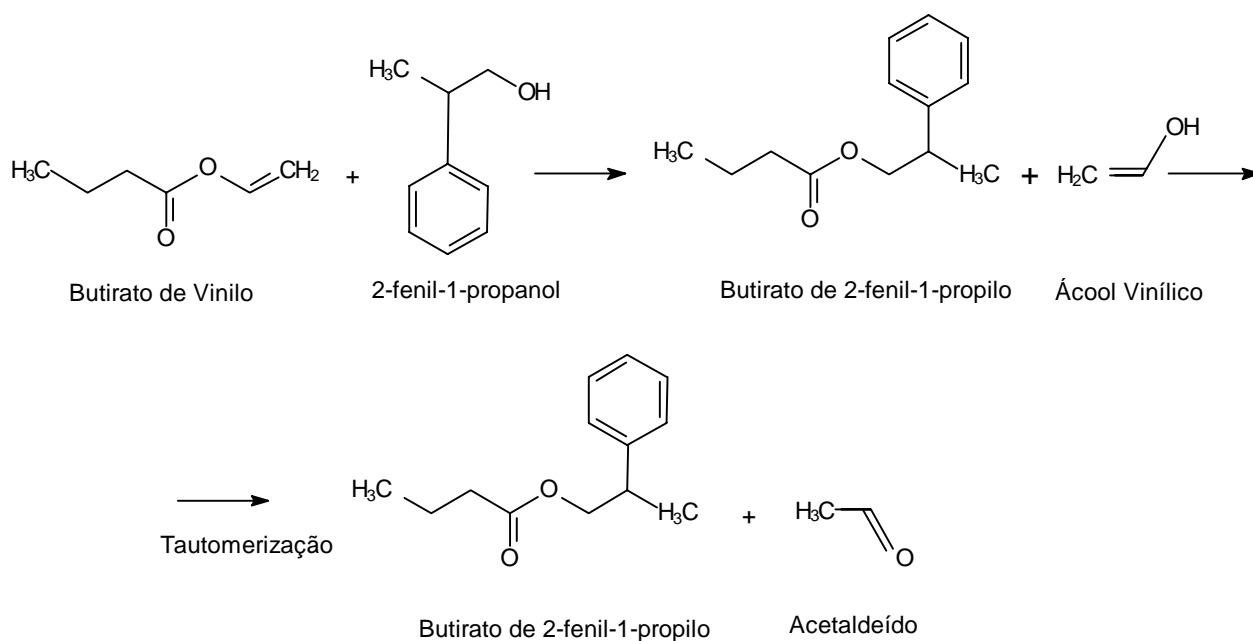
## 1 INTRODUÇÃO GERAL E OBJECTIVOS

A consciência cada vez maior da necessidade de utilização de tecnologias ambientalmente sustentáveis (“verdes”) tem conduzido à adopção de metodologias catalíticas mais eficientes para a produção de compostos químicos, como a catálise enzimática, e à utilização de solventes alternativos, como os fluidos supercríticos e os líquidos iónicos [Sheldon, 2005]. Os primeiros podem ser facilmente eliminados por simples descompressão, e os segundos não têm pressão de vapor mensurável.

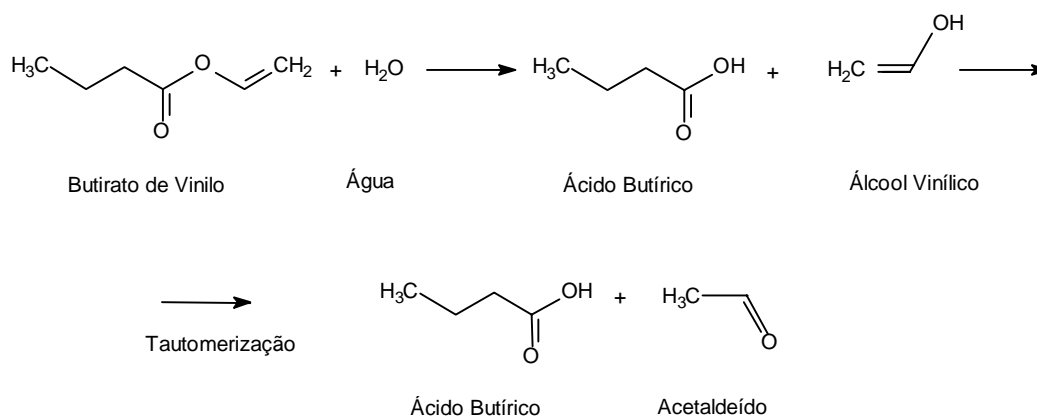
A presente dissertação tem como principal objectivo contribuir para um melhor conhecimento do comportamento das enzimas em meios não convencionais e, em particular, nas duas classes de solventes “verdes” acima referidas. As propriedades enzimáticas abordadas no presente estudo são a actividade e a enantioselectividade. A última é talvez a mais importante do ponto de vista de aplicações industriais das enzimas [Klibanov, 2001, Krishna, 2002, Ghanem e Abul-Enein, 2005]. Ao longo da dissertação, faz-se sempre o contraponto com os solventes orgânicos, nos quais foi realizada a maioria dos estudos fundamentais de biocatálise em solventes não aquosos até à data.

A enzima em que se baseia o presente estudo é a cutinase de *Fusarium solani pisi*, uma esterase de serina produzida e purificada no Centro de Engenharia Biológica e Química (Instituto Superior Técnico). Para comparação, utiliza-se a lipase B de *Candida antarctica* que é provavelmente a lipase mais utilizada em biocatálise.

A reacção alvo foi a transesterificação do butirato de vinilo pelo 2-fenil-1-propanol (Fig. 1.1), podendo também ocorrer a reacção secundária de hidrólise do butirato de vinilo (Fig. 1.2).



**Fig. 1.1** Reacção alvo: Transesterificação do butirato de vinilo com o 2-fenil-1-propanol.



**Fig. 1.2** Reacção secundária: hidrólise do butirato de vinilo.

## **ORGANIZAÇÃO**

Esta dissertação foi organizada da seguinte forma:

### **Capítulo 2 – Revisão bibliográfica**

Este capítulo aborda de uma forma sucinta a área de estudo – biocatálise em meios não aquosos. Começa com uma sumarização dos principais parâmetros relevantes nos estudos de catálise enzimática em solventes não convencionais: actividade da água, estado de ionização da enzima, solvente e suporte enzimático. Refere-se depois brevemente a utilização de baixas temperaturas, em especial do ponto de vista da enantioselectividade enzimática. Segue-se uma referência à aplicação, na biocatálise, de dois tipos de solventes “verdes”: fluidos supercríticos e líquidos iónicos. Por fim, faz-se a descrição das duas enzimas estudadas – uma esterase de serina e uma lipase – e indicam-se brevemente outras abordagens para optimizar o comportamento das enzimas em meios não aquosos.

### **Capítulo 3 – Actividade da Cutinase em Meios Supercríticos e Orgânicos: Efeitos da Actividade da Água e da Solvatação e Efeitos Ácido-Base**

Neste capítulo estuda-se o modo como os parâmetros actividade da água, estado de ionização da enzima, suporte enzimático (zeólitos) e solvente afectam a actividade da cutinase em dois solventes supercríticos e em dois solventes orgânicos.

### **Capítulo 4 – Estudo Comparativo de Biocatálise em Solventes Não-Convencionais: Líquidos Iónicos, Fluidos Supercríticos e Meio Orgânico**

Neste capítulo comparam-se as actividades da cutinase e da lipase B de *Candida antarctica* imobilizadas em três líquidos iónicos, dois fluidos supercríticos e um solvente orgânico. Utilizou-se ainda um sistema combinado de líquido iónico/dióxido de carbono supercrítico.

### **Capítulo 5 – Actividade e Enantioselectividade da Cutinase a Baixa Temperatura em Meios Não-Convencionais**

Neste capítulo comparam-se, numa gama de temperaturas que vão desde 35 °C até cerca de –20 °C, as actividades e enantioselectividades da cutinase imobilizada, em dois solventes

orgânicos e num líquido iónico. Apresenta-se ainda um estudo comparativo para a lipase B de *Candida antarctica* imobilizada.

## **Capítulo 6 – Conclusão geral**

No final desta dissertação apresenta-se um capítulo de conclusões gerais e sugestões para trabalho futuro.

## **Capítulo 7 – Referências Bibliográficas**

Neste capítulo estão incluídas todas as referências bibliográficas indicadas nos vários capítulos da dissertação.

Os conteúdos dos capítulos 3 e 4 foram reproduzidos dos seguintes artigos:

Garcia S., Vidinha, P., Arvana, H., Gomes da Silva, M. D.R., Ferreira, M. O., Cabral, M.S. J., Macedo E. A., Harper, N. e Barreiros, S., “Cutinase activity in supercritical and organic media: water activity, solvation and acid–base effects”, *J. Supercrit. Fluid.*, 2005, 35 62–69 (capítulo 3).

Garcia S., Lourenço, N. M. T., Lousa D., Sequeira, A. F., Mimoso, P., Cabral, J. M. S., Afonso, C. A. M. e Barreiros, S., “A comparative study of biocatalysis in non-conventional solvents: Ionic liquids, supercritical fluids and organic media”, *Green Chem.*, 2004, 6, 466–470 (capítulo 4).



## **CAPÍTULO 2**

### **Revisão Bibliográfica**



## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 BIOCATÁLISE EM SOLVENTES NÃO AQUOSOS (BSNA)**

As enzimas são catalisadores extremamente eficientes do ponto de vista do aumento de velocidade que proporcionam relativamente à reacção não catalisada. De um modo geral, a ligação do substrato à enzima é um processo que se dá com uma variação de energia de Gibbs negativa e que, portanto, estabiliza o substrato. É o facto de a afinidade da enzima para o estado de transição ser maior do que para o substrato que explica a diminuição da energia de Gibbs de activação associada à acção das enzimas [Price et al., 2001]. A eficiência energética destes catalisadores (funcionamento em condições experimentais suaves) constitui uma das suas principais vantagens relativamente aos catalisadores não biológicos. Contudo, é sem dúvida a selectividade que está na base da procura crescente de enzimas para aplicações industriais [Krishna, 2002, Turner, 2003, Ghanem e Abul-Enein, 2005], nomeadamente [Klibanov, 2001] a selectividade para o substrato (capacidade de discriminar substratos distintos mas estruturalmente semelhantes), a enantioselectividade (preferência por um ou outro enantiómero), a regioselectividade (preferência por um entre vários grupos funcionais idênticos na molécula de substrato) e a quimioselectividade (favorecimento de um determinado grupo funcional do substrato).

Nas últimas décadas, a biocatálise emergiu como uma tecnologia poderosa para a produção de muitos compostos importantes, como materiais para a síntese de polímeros, intermediários enantiomericamente puros para a produção de fármacos e agroquímicos, antibióticos, ingredientes para indústria alimentar, como adoçantes e vitaminas, etc. [Bertau, 2002, Krishna, 2002, Schoemaker et al., 2003, Ghanem e Aboul-Enein, 2005]. As primeiras aplicações das enzimas na indústria química envolviam biotransformações realizadas em meios aquosos. A associação da função enzimática a este tipo de meios constituiu um impedimento para uma utilização mais alargada das enzimas já que, em meio aquoso, a maior parte dos compostos orgânicos de interesse comercial são pouco solúveis ou mesmo instáveis, e muitos processos de interesse são pouco favoráveis

termodinamicamente [Klibanov, 2001]. Em 1984, desvaneceu-se o dogma relativamente à impossibilidade de utilizar solventes não aquosos na biocatálise [Zaks e Klibanov, 1984].

Entre as vantagens potenciais que tornam aliciantes a BSNA, contam-se [Dordick, 1989]:

- catálise de reacções difíceis de realizar em água, devido ao aumento da solubilidade de substratos, produtos e/ou outros componentes não polares;
- deslocamento do equilíbrio reaccional no sentido da síntese devido à redução do teor de água;
- facilidade de recuperação do biocatalisador e dos produtos da reacção;
- estratégias de imobilização facilitadas, por exemplo através do recurso a métodos físicos, visto as enzimas não se desadsorverem facilmente (excepto no caso de processos em contínuo).

Apesar de também haver potenciais desvantagens da BSNA, como baixas actividades enzimáticas, quando comparadas com meios aquosos, limitações difusionais, sobretudo no caso de catalisadores imobilizados, ou toxicidade (de alguns solventes orgânicos), o estudo pioneiro de Zaks e Klibanov [1984] foi seguido de muitos outros, e as aplicações comerciais deste tipo de sistemas têm-se multiplicado. São disso exemplo a produção de aminas e álcoois quirais para a produção de farmacêuticos e pesticidas, obtidos por hidrólise numa mistura de éter *t*-butil-metílico e metoxi-acetato de etilo catalisada pela lipase de *Burkholderia plantarii* imobilizada, realizada pela BASF, a produção de um fármaco anti-colesterol obtido por acilação em tolueno catalisada pela lipase de *Pseudomonas cepacia* imobilizada, realizada pela Bristol-Myers-Squibb, ou a produção de palmitato e miristato de isopropilo para a produção de sabões, cremes e lubrificantes, obtidos por esterificação em 2-propanol catalisada pela lipase da *Candida antarctica*, realizada pela Uniquema [Krishna, 2002].

Actualmente, a comunidade académica e industrial vê a biocatálise e, em particular, a BSNA, como uma área de pesquisa promissora, especialmente no desenvolvimento de processos ambientalmente sustentáveis. De facto, hoje em dia, entende-se como solventes não aquosos não apenas os tradicionais e problemáticos solventes orgânicos (tóxicos e prejudiciais ao ambiente), mas também uma gama de solventes que vão ao encontro da

recente área de investigação e desenvolvimento denominada de “química verde”, caracterizada essencialmente pelo desenvolvimento de processos ambientalmente benignos [Poliakoff et al., 2002, DeSimone, 2002]. Entre estes últimos, encontram-se os fluidos supercríticos (fluidos-sc) e os líquidos iónicos (*room-temperature ionic liquids*, LIs). Os fluidos-sc já são utilizados em biocatálise há vários anos [Randolph et al., 1985, Hammond et al., 1985, Nakamura et al., 1985], mas os LIs só mais recentemente têm sido utilizados para esse fim [Erbeldinger et al., 2000, Cull et al., 2000].

## **2.2 PARÂMETROS CRÍTICOS NA BSNA**

### **2.2.1 Água**

A água tem um papel preponderante na catálise em solventes não aquosos, essencialmente devido ao efeito relevante que desempenha nas propriedades que a enzima exhibe (actividade, estabilidade e selectividade) [Bell et al, 1995].

Na realidade, quando a água é adicionada a sistemas enzimáticos não aquosos, esta distribui-se entre a enzima, a fase do solvente e pelo suporte, quando utilizado. Assim, um dos aspectos importantes a ter em conta, mais do que a concentração da água no meio, é a sua disponibilidade para a enzima (hidratação da enzima), nomeadamente a sua interacção com o centro activo. De facto, a adição de água em solventes não aquosos leva a um aumento da mobilidade do centro activo, devido essencialmente a um incremento da sua flexibilidade e polaridade, através da formação de ligações de hidrogénio entre a água e os grupos funcionais da enzima [Klibanov, 1997]. A água tem, por assim dizer, um efeito plastificante na enzima [Rupley et al., 1983].

As enzimas são inactivas quando completamente secas, aumentando a sua actividade com o aumento do grau de hidratação, podendo funcionar com menos de uma monocamada de água por molécula de enzima [Klibanov, 1989 e Halling, 1994]. A quantidade de água óptima para a actividade enzimática depende do tipo de enzima utilizada [Wehtje et al., 1997, Ma et al., 2002, Valivety et al., 1992 a, e Valivety et al., 1992 b]. O perfil típico da actividade enzimática em função da hidratação da enzima apresenta um máximo correspondente ao valor óptimo de hidratação, abaixo e acima do qual actividade da

enzima é menor [Almeida et al., 1998]. Este perfil é influenciado pelo tipo de suporte, quando a enzima está imobilizada [Valivety et al., 1992 a]. Na fase inicial de hidratação, o aumento da água ligada à enzima tem um efeito benéfico a nível da flexibilização da mesma e do centro activo, em particular [Partridge et al., 1998]. No entanto, a presença de uma elevada quantidade de água pode facilitar a agregação da enzima ou dificultar o acesso de substratos ou produtos de e para o centro activo da mesma, o que incorre, normalmente, numa redução da actividade [Valivety et al., 1992 b]. Níveis elevados de água disponível para a enzima podem, ainda, conduzir à desnaturação da mesma, já que a mobilidade conformacional acrescida que advém de uma elevada hidratação permite à enzima ultrapassar o impedimento cinético que normalmente a impede de perder a estrutura nativa no meio não aquoso [Griebenow e Klibanov, 1996].

A disponibilidade da água também tem uma importância determinante na competição entre as reacções de síntese ou de hidrólise, como será referido mais adiante [Halling, 1994].

Um dos parâmetros normalmente utilizados em meios não aquosos para quantificar o nível de distribuição da água no meio (enzima, solvente e suporte enzimático) é o parâmetro actividade da água ( $a_w$ ) [Halling, 1994, Bell et al., 1995].  $a_w$  pode ser determinado através da equação  $a_w = \gamma_w x_w$ , em que  $\gamma_w$  é o coeficiente de actividade da água e  $x_w$  é a sua fracção molar. Os valores de  $a_w$  variam entre 0, para meios completamente secos, e 1, em solventes imiscíveis com a água saturados, ou em solventes miscíveis com a água de tal forma diluídos que a fracção molar da água é virtualmente 1.

$a_w$  pode ser medida directamente com sensores de humidade [Halling, 1994, Dossat et al., 1999], ou indirectamente, através da medição da concentração de água no meio reaccional pelo método de Karl-Fischer, e utilização de uma escala de  $a_w$  em função da concentração da água [Almeida et al., 1998]. Esta escala pode ser construída utilizando uma metodologia de fixação de  $a_w$ , ou então uma metodologia de fixação e controlo simultâneos daquele parâmetro:

- pré-equilíbrio do solvente, dos substratos, preparação de enzima e tampões sólidos (quando utilizados) com uma solução saturada de um sal, através da fase de vapor [Greenspan, 1977]. A pressão parcial da água no sistema é uma fracção da pressão de vapor da água à mesma temperatura, e depende do sal utilizado. Este método evita a

- utilização de substâncias adicionais no meio, mas não previne as alterações de  $a_w$  decorrentes do consumo ou formação de água durante o processo reaccional;
- adição *in situ* ao sistema reaccional de pares de sais hidratados (ou zeólitos, para obtenção de valores de  $a_w$  muito baixos) que, tal como referido atrás, conduzem a um determinado valor de pressão parcial da água [Halling, 1992]. Este método é muito prático para não só fixar, mas também controlar  $a_w$ , mas deverá ser utilizado com especial atenção dado que há evidência de que estes agentes (e também os zeólitos) poderem influenciar a actividade enzimática [Fontes et. al., 2002, Fontes et al, 2003 b], e, no caso específico de reacções de esterificação, podem não dar uma resposta suficientemente rápida às alterações de concentração de água no meio [Peres et al., 2003].

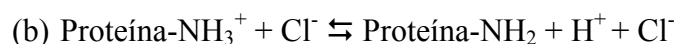
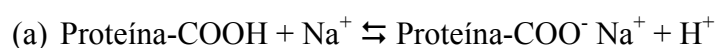
Os estudos cinéticos com enzimas em meios não aquosos devem ser efectuados a  $a_w$  constante, de modo a garantir que o grau de hidratação da enzima seja constante. Quando um meio reaccional é equilibrado a um determinado valor de  $a_w$ , apesar de poderem existir diferentes concentrações de água,  $a_w$  é o mesmo para todas as fases presentes. É assim possível determinar qual o valor de  $a_w$  óptimo associado ao melhor comportamento enzimático. Existe evidência de que o valor óptimo de  $a_w$  encontrado para uma determinada enzima é o mesmo, independentemente do solvente utilizado [Bell et al 1995], sugerindo assim que os solventes não afectam directamente a enzima, apesar da gama de velocidades envolvidas poder ser distinta quando se muda de solvente para solvente. De notar que existem alguns casos em que a correlação entre  $a_w$  e a hidratação da enzima pode não ser idêntica entre os diferentes solventes, levando a que iguais actividades de água possam originar diferentes graus de hidratação da enzima [Corrêa de Sampaio et al., 1996]. Estes desvios normalmente acontecem em solventes polares, os quais podem competir directamente com a água para a hidratação de resíduos menos polares da enzima e conduzirem a uma hidratação da enzima mais baixa relativamente a solventes menos polares [Bell et al., 1997].

### **2.2.2 Estado de ionização – efeitos ácido base**

Tal como em meios aquosos, a actividade enzimática é muito influenciada pelo estado de ionização da enzima. Contudo, enquanto que em solventes aquosos o estado de ionização

da enzima depende directamente do pH do meio, em meios não aquosos a enzima tende a assumir o estado de ionização da última solução aquosa à qual foi exposta (“memória de pH”) [Zaks e Klibanov, 1985].

Na realidade, o estado de protonação da enzima em meios não aquosos não depende apenas da actividade dos iões  $H^+$  presente no meio, tal como nos meios aquosos, mas também da actividade dos contra-íões, como  $Na^+$  e  $Cl^-$ , cuja intervenção é determinante na compensação da carga resultante da ionização dos grupos ácidos (a) e dos grupos básicos (b) da enzima em meios de constante dieléctrica baixa, como se mostra a seguir:



A actividade enzimática, em termos de efeitos ácido-base no estado de ionização, poderá assim ser influenciada por dois parâmetros independentes: pH-pNa e pH+pCl [Halling et al., 1996]. Para o controlo destes parâmetros existem dois tipos de tampões ácido-base sólidos específicos, que controlam um e outro parâmetro através da troca com a enzima de  $H^+$  e  $Na^+$ , no caso do pH-pNa, e de  $H^+$  e  $Cl^-$ , no caso de pH+pCl [Zaccharis et al., 1997, Harper et al., 2000, Partridge et al., 2000]. O primeiro tipo de tampões efectua o controlo do estado de ionização dos grupos ácidos da enzima, enquanto o segundo controla os grupos básicos. Estes tampões sólidos consistem essencialmente em pares de sais cristalinos contendo zwitteriões. Cada par de sais, no equilíbrio, estabelece um valor determinado da razão ou produto das actividades dos iões envolvidos.

Existe outro tipo de tampões ácido-base, solúveis em solventes orgânicos, com capacidade de controlar o estado de ionização das enzimas naqueles meios [Blackwood et al., 1993, Halling et al. 1996]. Contudo, não se generalizou a utilização destes tampões, não só porque a baixa solubilidade da forma iónica do sal em solventes orgânicos polares limitava o número de tampões apropriados para a biocatálise, mas também por poder ocorrer inibição da enzima pelos tampões, além de se introduzir a necessidade de um processo extra de separação, neste caso entre os tampões solúveis e os substratos/produtos [Partridge et al. 2000].



A monitorização do estado de ionização de uma enzima pode ser efectuada através de indicadores apropriados. Com um indicador cromoionofórico solúvel em meios não aquosos [Harper et al., 2000], monitorizou-se eficazmente o parâmetro pH-pNa em solventes orgânicos [Harper et al., 2000, Vidinha et al., 2004] e em fluidos-sc [Harper e Barreiros, 2002]. A actuação deste indicador baseia-se no facto de, ao formar um complexo com  $\text{Na}^+$ , apresentar um valor máximo da absorvância no espectro UV/visível.

Existem espécies usualmente utilizadas em reacções em solventes não aquosos que, por terem a capacidade de permutar iões, podem exercer um efeito ácido-base importante na enzima, tal como foi referido acima para os pares de sais hidratados [Fontes et al., 2003 b] e os zeólitos [Fontes et al., 2002], embora sem acção tamponizante.

### **2.2.3 Solvente**

O solvente utilizado afecta directa e indirectamente a actividade, estabilidade e selectividade da enzima.

A intervenção indirecta do solvente efectua-se a nível da partição da água, substratos e produtos para o microambiente da enzima. Quanto à água, este efeito é devido à propensão que determinados solventes têm para remover água da enzima (“water stripping”) [Zaks e Klibanov, 1988], levando a uma insuficiente hidratação da mesma e, conseqüentemente, a um decréscimo da actividade enzimática [Halling, 1994]. A extensão deste fenómeno é maior nos solventes hidrofílicos, pelo que os solventes hidrofóbicos são normalmente preferidos [Bell, et al., 1995]. Para tal, é utilizada por muitos autores uma correlação entre a hidrofobicidade do solvente e o efeito deste na actividade enzimática [Laane et al., 1987]. Este aspecto vem reforçar a ideia, anteriormente referida, de correlacionar a actividade catalítica da enzima com  $a_w$  já que, ao mesmo valor de  $a_w$ , a “sede” do solvente para a água é sensivelmente a mesma para todos os solventes, e o estado de hidratação da enzima terá também o mesmo valor.

A nível dos substratos e dos produtos, a interacção indirecta do solvente resulta do seu poder de solvatação que afecta a disponibilidade daqueles no meio reaccional. O solvente interfere assim na partição dos substratos para o centro activo, e dos produtos do centro activo para o solvente. Mais especificamente, o solvente afecta a estabilização do

substrato, normalmente traduzida pela diferença de energias de Gibbs ( $\Delta G$ ) entre o complexo enzima-substrato e o substrato livre [Halling, 1994]. Em muitos casos,  $\Delta G$  pode ser quantificada pela constante  $K_M$  de Michaelis (constante de dissociação) que é tanto mais elevada quanto maior afinidade os substratos tiverem para o solvente, e portanto quanto menor disponibilidade tiverem para o centro activo da enzima [Bell et al., 1995]. Na literatura, encontram-se muitos outros exemplos deste efeito [Ryu e Dordick, 1992, Secundo et al., 1992, Corrêa de Sampaio et. al., 1996].

Os efeitos directos do solvente podem resultar da penetração de moléculas de solvente no centro activo da enzima, causando alterações de polaridade no centro activo e afectando a ligação substrato - enzima, [Ryu e Dordick, 1992, Kim e Dordick, 1993]. A acção directa do solvente pode ainda resultar da competição directa entre as moléculas de solvente e as do substrato para a ligação ao centro activo da enzima, levando a uma diminuição da actividade catalítica [Corrêa de Sampaio et al., 1996]. Foram efectuados estudos que indicaram que as espécies orgânicas menos polares apresentavam uma maior propensão para este tipo de competição [Halling, 1994].

Um exemplo que ilustra bem os efeitos directos do solvente não aquosos na actividade enzimática é o caso do  $\text{CO}_2$ -sc que, apesar de apresentar uma série de benefícios referidos adiante, pode afectar negativamente a actividade enzimática [Almeida et al., 1998, Borges de Carvalho et al., 1996, Fontes et al. 2001 a, Harper e Barreiros, 2002, Kamat et al., 1995, Marty et al., 1992]. Supõe-se que este efeito é devido à formação de ácido carbónico no microambiente da enzima e/ou devido a ligações covalentes com grupos amina da enzima, através da formação de carbamatos [Kamat, et al., 1995].

#### **2.2.4 Suporte enzimático**

O recurso à imobilização de enzimas em suportes sólidos deve-se essencialmente ao facto destes conferirem à enzima uma maior estabilidade [Colacino e Crichton, 1997] e uma melhor dispersão nos solventes não aquosos. Por outro lado, a enzima quando imobilizada encontra-se num ambiente (força iónica, pH, moléculas de água) totalmente diferente do existente quando no estado livre, sendo assim de prever que os suportes exerçam uma

grande influência no comportamento da enzima [Reslow, et al., 1988, Gonçalves et al., 1997].

A imobilização da enzima num suporte pode fazer-se por ligação covalente, por adsorção física (mediante o estabelecimento de ligações de hidrogénio, forças de van der Waals, interações hidrofóbicas ou electrostáticas entre enzima e suporte) [Bosley e Clayton, 1994, Gonçalves, et al., 1997, Partidge et al., 1998, Palomo et al., 2002], através da oclusão da enzima numa matriz de plástico ou de sol-gel [Van Unem, 2001, Ozotop et al, 2003, Vidinha et al., 2005], ou ainda através do estabelecimento de ligações cruzadas entre moléculas de enzima (cross-linking), sem recurso a um suporte [St Clair e Navia, 1992, Fontes et al., 2001 a, Cao et al., 2003]. Se, por um lado, a interacção enzima – suporte pode atribuir uma determinada conformação à enzima, levando a um incremento da actividade [Vidinha et al., 2005], por outro pode levar a uma perda desta, por alteração das interações que sustentam a estrutura tridimensional da enzima [Palomo et al., 2002]. No entanto, a estabilidade acrescida da enzima deverá compensar os inconvenientes de uma eventual perda de actividade por imobilização.

As propriedades físico-químicas do suporte (área superficial, dimensões dos poros e das partículas, composição química, estrutura, etc.), podem interferir na quantidade de enzima que é ligada ao suporte, na partição dos substratos e produtos, e na quantidade de água disponível para a reacção enzimática [Adlerceurtz, 1991, Lee e Parking, 2001, Secundo et al., 1999]. As propriedades do suporte influenciam em conjunto todos estes parâmetros, sendo difícil discriminar o impacto de cada uma em separado. Em princípio, um suporte para imobilização enzimática deverá ter uma boa área superficial e apresentar diâmetro de poro suficiente para que ocorra a difusão apropriada dos substratos e dos produtos, aspecto que assume particular importância quando a enzima se encontra no interior da estrutura porosa. Por outro lado, a composição química do suporte (tipo e distribuição dos grupos funcionais presentes na superfície ou no interior do suporte, hidrofobicidade, etc.) terá também que ser adequada, visto ser determinante nas interações enzima – suporte, na partição de água, etc.

Na presente dissertação, as enzimas estudadas encontram-se imobilizadas, uma por adsorção à superfície de um zeólito (cutinase), e outra por ligação iónica a uma resina acrílica macroporosa (lipase de *Candida antarctica*).

Os zeólitos pertencem à classe dos silicoaluminatos. São formados por estruturas tetraédricas de  $\text{SiO}_4^-$  e  $\text{AlO}_4^-$ , ligadas entre si por átomos de oxigénio, dando origem a uma estrutura cristalina de grandes dimensões, com poros e cavidades contendo catiões (passíveis de troca) e água (passível de remoção) [Weitkamp, 2000]. Os diferentes arranjos dos tetraedros dão origem a uma grande diversidade de estruturas cristalinas, com diferentes tamanhos de poro (pequeno, entre os 3 e 5 Å; médio, entre os 5 e 6 Å; largo, entre os 6 e 9 Å; extra-largo, superior a 9 Å) [Weitkamp, 2000]. As características dos zeólitos levam à sua utilização em muitos processos, sendo já bem conhecida a sua aplicação na adsorção de várias espécies químicas (e.g. parafinas, xileno, olifinas, oxigénio, etc.) [Mohanty e McCormic, 1999], como permutadores de iões [Ribeiro Ramôa et al., 1996] e, mais recentemente, como suportes de imobilização de biocatalisadores [Gonsalves, 1996, Gonsalves, 1997, Knezevic Z., 1998, Serralha et al., 1998 e Serralha et al., 2001]. As principais características que tornam os zeólitos atractivos para aquelas aplicações são:

- elevada área superficial devido à estrutura microporosa (o volume de poros pode atingir 50 % do volume do zeólito);
- selectividade de forma (tipo peneiro molecular) que resulta da existência de uma grande variedade de microestruturas de zeólitos (diferentes tamanhos de poros adequados a diferentes moléculas), com interesse na catálise e na adsorção;
- facilidade em modificar a razão sílica / alumina, a natureza e o teor dos catiões no seu interior, o que possibilita regular o carácter ácido – base (acidez de Brönsted e de Lewis) e o carácter hidrofílico – hidrofóbico do zeólito, conferindo-lhe uma capacidade de adsorção fortemente selectiva.

No presente trabalho, foram utilizadas as formas sódicas do zeólito A (NaA) e Y (NaY), assim designadas por conterem nas suas cavidades o catião  $\text{Na}^+$ . O zeólito NaY, com uma razão Si/Al superior a 1,5, é mais ácido e menos hidrofílico do que o zeólito NaA, com uma razão Si/Al igual a 1. O zeólito NaY apresenta poros de 7,8 Å de diâmetro (zeólito de

poro largo), enquanto o zeólito NaA apresenta poros de 4,2 Å de diâmetro (zeólito de poro pequeno). Em ambos os casos, há também poros com diâmetro de 2,2 Å.

A utilização de resinas acrílicas como suportes catalíticos remonta à década de 50, estando esta metodologia já vulgarizada em muitas aplicações comerciais, na indústria farmacêutica, indústria de detergentes, indústria alimentar, etc. [Kosugi et al., 1995, Pandey, 1999, Salunkhe e Nair, 2000]. Estão bem documentados os protocolos de imobilização, características e aplicações destes suportes a várias classes de enzimas [Boller et al., 2002], e a sua utilização em solventes não aquosos faz-se há duas décadas [Reslow, et al., 1988]. O suporte utilizado na imobilização da lipase de *Candida antarctica* utilizada no presente trabalho foi fornecido pela Bayer e tem a designação Lewatit VP OC 1600. É constituído por partículas com 160 a 1000 µm, com uma porosidade de 35 a 45 %, e tem diâmetros de poro entre 140 e 170 Å [informação fornecida pela empresa Novo Nordisk].

### **2.2.5 Baixa temperatura**

O recurso a baixas temperaturas foi utilizado como estratégia para retardar reacções enzimáticas de modo a tornar possível a detecção de intermediários de vida curta e, assim, elucidar mecanismos reaccionais [Douzou et al., 1970]. Na altura, a BNSA não tinha surgido, e estes estudos foram realizados em meios aquosos com co-solventes ou aditivos que impedissem o congelamento.

A análise da função enzimática a baixas temperaturas recebeu um novo impulso nos últimos anos. Os organismos psicrófilos vivem em habitats frios e produzem enzimas adaptadas a condições ambientais mais extremas do que as normalmente associadas ao seu funcionamento. Espera-se que o estudo da adaptação estrutural das enzimas a essas condições seja importante do ponto de vista fundamental e possa depois vir a ser explorado ao nível das aplicações [Georlette et al., 2004, Hoyoux et al., 2004].

Com o advento da BNSA e a verificação da estabilidade acrescida das enzimas em meios não aquosos com muito pouca água [Zaks e Klivanov, 1984], começou a olhar-se mais no sentido inverso, ou seja, no sentido da temperatura máxima a que as enzimas se mantêm

cataliticamente activas, o que depende da forma como as enzimas conseguem resistir ao efeito desnaturante das temperaturas elevadas [Turner e Vulfson, 2000].

No entanto, a utilização de baixas temperaturas também tem sido relevante no contexto da BSNA, nomeadamente do ponto de vista da enantioselectividade. O impacto da temperatura nesta propriedade já foi reconhecido há cerca de vinte anos [Keinan et al., 1986, Lam et al., 1986]. Pham et al. [1989] verificaram inclusivamente a existência de uma temperatura racémica à qual se invertia a preferência da enzima relativamente aos enantiómeros. Tal como sugerido por Holmberg e Hult [1991] e Phillips [1996], a manipulação da temperatura tornou-se uma forma útil de fazer um ajuste fino da estereoquímica de reacções catalisadas por enzimas, sobretudo desde que Sakai et al. [1997] utilizaram o abaixamento da temperatura de 30 para  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  para aumentarem de cerca de cinco vezes a enantioselectividade de uma lipase. De facto, a utilização de meios não aquosos possibilita a extensão da gama útil de temperaturas até valores suficientemente baixos para causar um impacto elevado na enantioselectividade quando esta é baixa à temperatura ambiente [Ljubovic et al., 1999]. A abordagem de Sakai et al. [1997], agora conhecida como “método da baixa temperatura” [Sakai et al., 2003 b], tem sido seguida desde então, conforme revisto por Sakai [2004].

## **2.3 BIOCATÁLISE EM FLUIDOS SUPERCRÍTICOS**

O estado supercrítico ocorre quando uma substância se encontra em condições de pressão e temperatura acima da pressão e temperatura do ponto crítico respectivo ( $P_c$ ,  $T_c$ ). A temperaturas superiores a  $T_c$ , a forma gasosa da substância não pode ser liquefeita por maior que seja a pressão aplicada, essencialmente devido ao movimento molecular intenso que impede um balanço positivo favorável das atracções intermoleculares necessárias à formação de um líquido.

A importância e vantagens da utilização dos fluidos-sc são perfeitamente reconhecidas nas várias vertentes da engenharia química e bioquímica, como a extracção/processamento de fármacos [Duarte et al., 2005], de substâncias relevantes na indústria alimentar [Simões et al., 1998, Ruivo et al., 2004], de metais [Erkey, 2000], de compostos biológicos [Andrich et al., 2005], de gorduras naturais na indústria de curtumes [Marsal et al., 2000], em

sistema integrado com tecnologia de membranas [Sarrade et al., 2003], no desenvolvimento de novos materiais [Cansell et. al., 2003], como polímeros [Casimiro et al., 2005], partículas finas [Hakuta et al., 2003], aerogéis [Moner-Girona et al., 2003], na catálise [Milewska et al., 2005] e, em particular, na biocatálise [Peres et al., 2005, Vidinha et al., 2005].

Após a primeira evidência da viabilidade da utilização de solventes orgânicos em biocatálise com impacto na comunidade científica [Zaks e Klibanov, 1984], a aplicação de fluidos-sc como solventes alternativos rapidamente mostrou ser uma possibilidade promissora [Randolph et al., 1985, Hammond et al., 1985, Nakamura et al., 1985]. A principal característica que torna estes fluidos verdadeiramente aliciantes resulta do facto de aliarem as propriedades específicas de um líquido (densidade e condutividade térmica elevadas) e de um gás (baixas viscosidade e tensão superficial, e elevada difusividade), conjugando um bom poder de solvatação e transferência de calor, próprios dos líquidos, com uma transferência de massa mais eficaz, normalmente aliada aos gases. Para além deste aspecto, a utilização de fluidos-sc como solventes em biocatálise tem vantagens efectivas sobre os seus homólogos orgânicos, tais como:

- maior facilidade na penetração dos poros do bicalisador, muitas vezes inacessíveis aos líquidos convencionais [Kamat et al., 1995];
- possibilidade de variar o poder de solvatação do solvente, ajustando a pressão e temperatura [Mesiano et al., 1999], especialmente próximo do ponto crítico;
- o fraccionamento da mistura reaccional, sem ocorrer alteração de solvente, é possível através de passos sequenciais com redução sucessiva de pressão;
- facilidade de eliminação do solvente, visto os fluidos-sc poderem ser eliminados por simples descompressão.

Os fluidos-sc mais adequados para biocatálise apresentam valores de  $T_c$  entre 35 °C e 50 °C e valores de  $P_c$  abaixo dos 100 bar (Tabela 2.1).

**Tabela 2.1** Temperatura e pressão críticas das algumas substâncias utilizadas como fluidos-sc em biocatálise.

| <b>Fluido</b>           | <b>T<sub>c</sub> (°C)</b> | <b>P<sub>c</sub> (bar)</b> |
|-------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Dióxido de Carbono      | 31,1                      | 73,8                       |
| Etano                   | 32,3                      | 48,8                       |
| Etileno                 | 9,3                       | 50,3                       |
| Hexafluoreto de Enxofre | 45,6                      | 37,6                       |
| Fluorofórmio            | 25,9                      | 48,8                       |

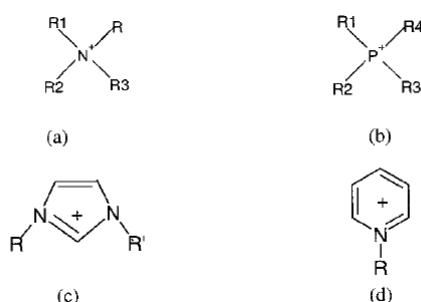
As variações de densidade do meio supercrítico por manipulação de pressão e/ou temperatura conduzem a efeito significativos na constante dielétrica e no poder solvente dos fluidos-sc, podendo ter consequências importantes na actividade, especificidade e enantioselectividade enzimáticas [Randolph et al., 1988, Kamat et al., 1993, Fontes et al., 1998 b, Mesiano et al., 1999]. Nestes solventes, e para além de todos os factores condicionantes da BSNA já referidos no ponto 2.2, acresce a pressão [Boonyaratanakornkit, 2002]. Para além das alterações das propriedades do solvente que as variações de pressão causam [Almeida et al., 1998], podem por si só ter efeitos directos na velocidade da reacção. De facto, quanto maior é o volume do estado de transição face ao volume dos substratos (volume de activação positivo), maior será a diminuição da constante de velocidade da reacção e, consequentemente, da eficiência catalítica da enzima por aumento da pressão [Fontes et al., 1998 a]. A estabilidade do biocatalisador pode, por sua vez, ser afectada pela pressão mediante alterações na estrutura e conformação da enzima [Mozhaev et al., 1996]. A inactivação da enzima ocorre normalmente a partir de 1 kbar [Mozhaev et al., 1994], o que deixa uma margem de segurança bastante confortável à biocatálise em fluidos-sc que se realiza geralmente a pressões entre os 100 e os 300 bar.



## 2.4 BIOCATÁLISE EM LÍQUIDOS IÔNICOS

Os LIs emergiram recentemente como solventes alternativos aos meios orgânicos em processos biotecnológicos [Erbeldinger et al., 2000, Cull et al., 2000]. Deste então, a sua utilização tem sido amplamente estudada como solventes em catálise [Webb et al., 2003, Najdanovic-Visak et al., 2003] e, em particular, na biocatálise [Rantwijk et al., 2003, Sheldon, 2005].

Os LIs são inteiramente constituídos por iões, diferindo dos clássicos sais fundidos devido aos seus baixos pontos de fusão, geralmente abaixo dos 100-150 °C, sendo igualmente menos corrosivos. Os líquidos que usualmente são utilizados em catálise e, principalmente, em biocatálise apresentam pontos de fusão inferiores à temperatura ambiente. Os LIs mais comuns baseiam-se em catiões orgânicos, como tetralquilamónio, alquilpiridínio, 1,3-dialquilimidazólio e tetralquilfosfónio (Fig. 2.1), associados a aniões com fortes cargas negativas, tais como  $\text{BF}_4^-$ ,  $\text{PF}_6^-$ ,  $\text{SbF}_6^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{CF}_3\text{SO}_3^-$ , entre outros [Sheldon, 2005].



**Fig. 2.1** Estruturas dos catiões mais comuns em LIs. (a) tetralquilamónio. (b) tetralquilfosfónio. (c) 1,3-dialquilimidazólio. (d) alquilpiridínio.

Entre as principais vantagens dos LIs relativamente aos solventes orgânicos, contam-se uma pressão de vapor desprezável, elevada estabilidade química e térmica [Wilkes e Zaworotko, 1992] e fácil reciclagem, o que coloca os LIs na classe de solventes ambientalmente sustentáveis [DeSimone, 2002]. Em todo o caso, continuam os estudos focados na avaliação de riscos potenciais dos LIs no ciclo completo de vida dos mesmos [Jartorff et al., 2003, Jastorff et al., 2005].

Um dos aspectos únicos dos LIs reside no facto de ser possível conceber e sintetizar um LI com determinadas características de densidade, viscosidade, ponto de fusão, polaridade e miscibilidade com a água, mediante a selecção do catião orgânico, do anião inorgânico e do tamanho da cadeia ligada ao catião inorgânico [Gordon, 2001].

A actividade catalítica das enzimas é fortemente influenciada pela estrutura dos LIs [Itoh et al., 2001], bem como o seu estado de purificação [Park e Kazlauskas, 2001]. Há evidência de que, nalguns casos, estes solventes podem melhorar o comportamento das enzimas relativamente aos solventes orgânicos, em termos de actividade catalítica e enantioselectividade [Noël et al., 2004], e estabilidade [Kaar et al., 2003, Lozano et al., 2002]. Em particular, Sheldon et al. [2002] e Lozano et al. [2002] verificaram que uma determinada lipase, na forma livre, ou imobilizada, exhibia uma estabilidade térmica bastante superior quando colocada num LI do que em solventes orgânicos, o que poderia ser explicado, segundo os autores, por uma espécie de cobertura protectora que o LI exercia no microambiente da enzima. Estudos espectroscópicos mais recentes com uma protease e uma lipase mostram que a estabilidade acrescida destas enzimas nos LIs se deve a alterações estruturais que resultam numa estrutura mais compacta, com maior percentagem de folhas  $\beta$  [De Diego et al., 2004, De Diego et al., 2005].

## **2.5 BIOCATÁLISE EM LÍQUIDOS IÓNICOS/CO<sub>2</sub>-SC**

Apesar da biocatálise em LIs ocorrer na ausência de solventes orgânicos, a recuperação dos produtos da reacção era, até recentemente, normalmente efectuada com recurso àqueles solventes, o que era um obstáculo à classificação do processo como “verde”. No entanto, a combinação de um LI com CO<sub>2</sub>-sc constitui uma estratégia “verde” para biotransformação e separação que colmata a referida lacuna [Lozano et al., 2002, Reetz et al., 2002, Dzyuba e Bartsch, 2003]. Nestes processos, tem-se um sistema bifásico em que o LI actua como solvente para a reacção enzimática, e o CO<sub>2</sub>-sc actua como fase de extracção dos produtos. Em processos em contínuo, o CO<sub>2</sub>-sc actua também como fase móvel para transporte dos substratos para a enzima.

Na base da utilização dos sistemas combinados de LI/CO<sub>2</sub>-sc na biocatálise estão os estudos efectuados por Blanchard et. al. [1999] que observaram que o equilíbrio de fases entre o CO<sub>2</sub>-sc e o LI [C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>] se caracterizava por uma dissolução elevada do primeiro no segundo, sem que aquele LI se dissolvesse no CO<sub>2</sub>-sc. Outra característica importante daquele sistema era a diminuição de viscosidade do LI com CO<sub>2</sub> dissolvido e, consequentemente, uma maior facilidade na transferência de massa. Mais tarde, os mesmos autores verificaram que estas particularidades se estendiam a outros LIs [Blanchard et. al., 2001]. Simultaneamente, surgiram publicações que demonstravam a viabilidade de recuperar dos LIs solutos orgânicos, alifáticos polares e não polares, e aromáticos, utilizando CO<sub>2</sub>-sc [Kazarian, et al., 2000, Blanchard e Brennecke, 2001, Scurto et al., 2002]. Estavam assim criadas as condições para que surgissem os primeiros estudos de catálise em sistemas bifásicos LI/CO<sub>2</sub>-sc, nos quais catalisadores não biológicos e intermediários polares se encontravam dissolvidos no LI enquanto os reagentes e/ou produtos da reacção apolares se encontravam dissolvidos no CO<sub>2</sub>-sc [Liu et al., 2001, Brown et al., 2001]. Pouco depois, o conceito estendeu-se à biocatálise [Lozano et al., 2002, Reetz et al., 2002, Lozano et al., 2003, Reetz et al., 2003, Lozano et al., 2004].

## **2.6 LIPASES E ESTERASES DE SERINA**

As enzimas são classificadas, consoante o tipo de reacção que catalisam, em seis grupos principais: oxido-redutases (catalisam reacções de oxidação-redução), transferases (catalisam a transferência de um átomo ou grupo químico entre dois compostos), hidrolases (catalisam reacções de hidrólise, actuando sobre vários tipos de ligações como ligação éster, peptídica, C-N não peptídica, C-C, P-N, etc.), liases (catalisam reacções de remoção ou fixação de grupos químicos envolvendo ligações C-C, C-N e C-O, de forma não hidrolítica, deixando duplas ligações), isomerases (catalisam reacções de isomerização envolvendo estereoisómeros) e ligases (catalisam reacções de ligação de duas moléculas acoplada à hidrólise do ATP) [Cabral et al., 2003].

Embora as aplicações industriais das enzimas em geral estejam a aumentar [Cabral et al., 2003, Schnell et al., 2003, Krishna, 2002, Kirk et al., 2002, Schmid et al., 2002], as enzimas mais utilizadas na indústria, incluindo a BNSA, são as hidrolases (proteases,

celulases, amilases, esterases e lipases). Entre as razões que tornam as hidrolases uma opção particularmente atractiva, contam-se a disponibilidade, custo, facilidade de operação, dado não necessitarem de co-factores, aceitação de uma grande gama de substratos e grande capacidade de distinguir a quiralidade molecular [Chikusa et al., 2003, Krishna, 2002].

De entre as hidrolases, as lipases são os biocatalisadores mais importantes, dado poderem ser produzidas em grandes quantidades por fungos e bactérias e estarem disponíveis as estruturas cristalinas de muitas, o que facilita a racionalização das suas propriedades [Jaeger e Eggert, 2002, Ema, 2004, Lutz, 2004, Micaelo et al., 2005, Ghanem e Aboul-Enein, 2005]. Em meios não aquosos, estas enzimas catalisam reacções de hidrólise, esterificação, transesterificação (acidólise, interesterificação, alcoólise) e aminólise, com elevada selectividade, reduzindo assim os produtos secundários e diminuindo o custo das operações unitárias de recuperação dos produtos [Villeneuve et al., 2000]. As esterases de serinas, por exibirem um comportamento catalítico semelhante ao das lipases, apresentam idênticas potencialidades na BSNA [Carvalho et al., 1999].

As lipases e esterases de serina pertencem ao grande grupo das  $\alpha / \beta$  hidrolases. Apresentam uma estrutura molecular semelhante, caracterizada por uma estrutura terciária formada por um núcleo central com cinco cadeias em folha  $\beta$ , coberto num dos lados por duas hélices  $\alpha$  e, do outro, por três. Também o centro activo é semelhante nas lipases e nas esterases de serina. Este é uma tríade catalítica constituída pelo grupo reactivo propriamente dito, que é o resíduo de serina, e outros dois aminoácidos com grande influência no mecanismo catalítico – o aspartato e a histidina, que funcionam numa espécie de rede de ligações de hidrogénio: o aspartato actua como nucleófilo na sua ligação à histidina, a qual actua como nucleófilo na sua ligação à serina, sendo esta o único aminoácido que se liga efectivamente ao substrato (ponto 2.6.3).

A diferença principal entre as lipases e as esterases de serina reside na acessibilidade do centro activo, o que conduz a diferentes comportamentos consoante o solvente. As esterases de serina actuam apenas sobre monómeros em solução aquosa, visto terem o centro activo acessível ao solvente, e exibem actividade estereolítica elevada pois os substratos acedem livremente ao centro activo. As lipases apresentam uma actividade

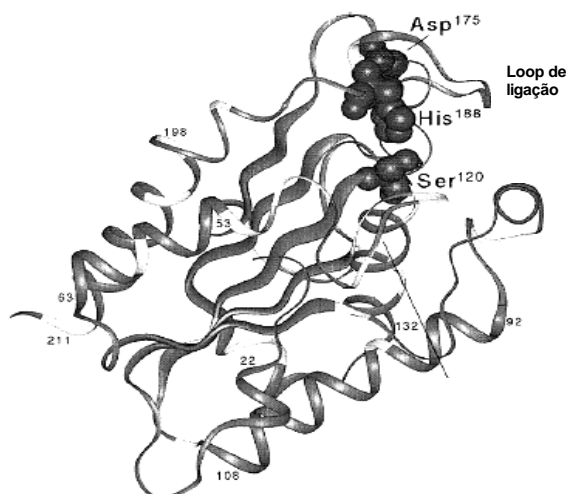
estereolítica muito baixa em solução aquosa. Isto acontece porque o centro activo das lipases está coberto por um pequeno segmento de estrutura  $\alpha$  de natureza anfifílica (aminoácidos de natureza polar na parte externa da hélice, e aminoácidos apolares na parte interna, a qual está em contacto directo com o centro activo). Em soluções aquosas, esta tampa encontra-se fechada, não permitindo o acesso do substrato ao centro activo [Brzozowski, 1991]. É necessária a presença de uma interface de natureza hidrofóbica que, ao interagir com a parte hidrofóbica da tampa, estabilize a conformação da lipase na posição de tampa aberta, para tornar o centro activo acessível. Assim, as lipases em meio aquoso apresentam um melhor desempenho no que respeita à actividade lipolítica, ou seja, quando em presença de agregados de substrato. Um solvente não aquoso pode actuar da mesma maneira [Turner et al., 2001].

Na presente dissertação, utilizaram-se estes dois tipos de hidrolases, nomeadamente a cutinase de *Fusarium solani pisi*, que é uma esterase de serina, imobilizada nos zeólitos NaA NaY, e a lipase B de *Candida antarctica*, imobilizada numa resina macroporosa (Novozym 435).

### 2.6.1 Cutinase de *Fusarium Solani Pisi*

A cutinase provém de fungos fitopatogénicos. Tem como principal função a degradação da cutina, componente estrutural da cutícula que cobre os vegetais superiores. Os fungos excretam-na para o exterior da célula, degradando a cutina, conseguindo assim penetrar no interior das células e provocar infecção na planta [Lauwereys et al., 1990]. A cutinase de *Fusarium solani pisi* é constituída por uma única cadeia peptídica com um elevado número de aminoácidos apolares. Tem um peso molecular de cerca de 22,5 kDa, e as dimensões de (45x30x30) Å<sup>3</sup>. O centro activo é constituído pela tríade catalítica Serina 120- Histidina 188-Aspartato 175 e pela cavidade de ligação ao oxianião, sendo este último responsável pela estabilização do estado de transição [Carvalho et al., 1999, Haeffner et al., 1998]. O centro activo está acessível ao solvente, encontrando-se numa das extremidades da enzima (Fig. 2.1). Contudo, localiza-se numa cavidade formada entre dois “loops” de carácter hidrofóbico, e o acesso ao mesmo está parcialmente tapado por duas pontes formadas pelas cadeias laterais de dois pares de aminoácidos. Na presença de substratos hidrofóbicos, os loops reorientam-se, permitindo o acesso ao centro activo num movimento do tipo pulso,

sem provocar alterações na posição dos resíduos da cavidade do oxianião, que já se encontram na posição adequada para a catálise. Esta característica distingue a cutinase das suas homólogas lipases. [Carvalho et al., 1999].



**Fig. 2.2** Estrutura da cutinase, destacando a tríade catalítica [Carvalho et al., 1999]

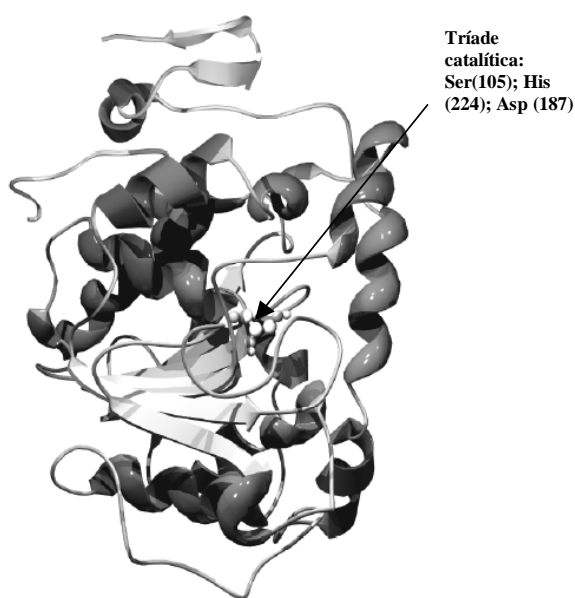
A cutinase apresenta um comportamento intermédio entre as lipases e as esterases, devido essencialmente à topografia e natureza do seu centro activo. Por um lado, a cutinase apresenta, tal como é próprio das esterases, o centro activo acessível ao substrato (os dois *loops* apenas o cobrem parcialmente), não necessitando assim de activação interfacial. Contudo, apresenta actividade lipolítica, típica das lipases, dado os resíduos do centro activo se encontrarem, como foi referido, numa cavidade de natureza hidrofóbica, permitindo a ligação da enzima a agregados de substrato. Assim, a cutinase apresenta um tipo de estrutura e propriedades catalíticas únicas ao combinar vantagens das esterases e das lipases [Carvalho et al., 1999]. A cutinase pode por isso ser utilizada em quase todos os processos que envolvam lipases, como na indústria dos detergentes, do papel, alimentar, cosmética, farmacêutica, agroquímica, etc. Pode ainda ser utilizada como biocatalisador sob diversas formas: liofilizada, microencapsulada, modificada quimicamente, e imobilizada [Carvalho et al., 1999].

Neste trabalho, utilizou-se cutinase produzida a partir de uma estirpe de *Escherichia coli*.

### 2.6.2 Lipase B de *Candida antarctica* (CALB)

De entre as várias lipases utilizadas em biocatálise, a CALB é uma das mais referidas. Esta enzima tem-se demonstrado particularmente útil na síntese de ésteres e aminas, sendo altamente regioselectiva na síntese de monoésteres de carboidratos, e enantioselectiva na resolução de inúmeros compostos, nomeadamente aminas, álcoois e ácidos [Öhrner et al., 1996, Rotticci et al., 2001].

A CALB é uma lipase constituída por 317 aminoácidos, com um peso molecular de cerca de 33 kDa. O centro activo desta enzima é constituído pela tríade catalítica Serina 105-Histidina 224-Aspartato 187 [Uppenberg et al. 1994]. Ao contrário da maioria das lipases, a CALB não apresenta activação interfacial, dado não possuir a tampa característica da maior parte das lipases. No entanto, o acesso ao centro activo faz-se por um estreito canal, existindo ainda uma pequena hélice com uma elevada mobilidade perto do centro activo (Fig. 2.3) [Uppenberg et al., 1994].



**Fig. 2.3** Estrutura da CALB, destacando a tríade catalítica.

Existem várias preparações da CALB disponíveis no mercado, na forma livre ou imobilizada através de ligações covalentes, mais indicadas para reacções em meios aquosos, ou imobilizada através de ligação iónica, mais utilizada em meios não aquosos [Rotticci et al., 2001]. Quando imobilizada, a CALB apresenta elevada estabilidade na gama de temperaturas 60-80 °C, por longos períodos de tempo [Anderson et al., 1998].

Neste trabalho, utilizou-se CALB produzida a partir do microorganismo geneticamente modificado *Aspergillus*.

### **2.6.3 Mecanismo reaccional das lipases e das esterases de serina**

Estas enzimas seguem um mecanismo denominado de *ping-pong bi-bi* que consiste na adição ordenada de um primeiro substrato e libertação de um primeiro produto, seguida da ligação de um segundo substrato e libertação de um segundo produto. O primeiro passo, de acilação, inicia-se com a formação de um complexo não covalente enzima-substrato e prossegue com a libertação do primeiro produto e a formação de um intermediário estável denominado de acil-enzima. O segundo passo, de desacilação, inicia-se com a actuação do segundo substrato na acil-enzima e leva à formação de um segundo complexo não covalente enzima-produto que seguidamente origina o segundo produto [Warshel et al., 1989, Daggett et al., 1991, Schmitke et al., 1996, Hedstrom, 2002].

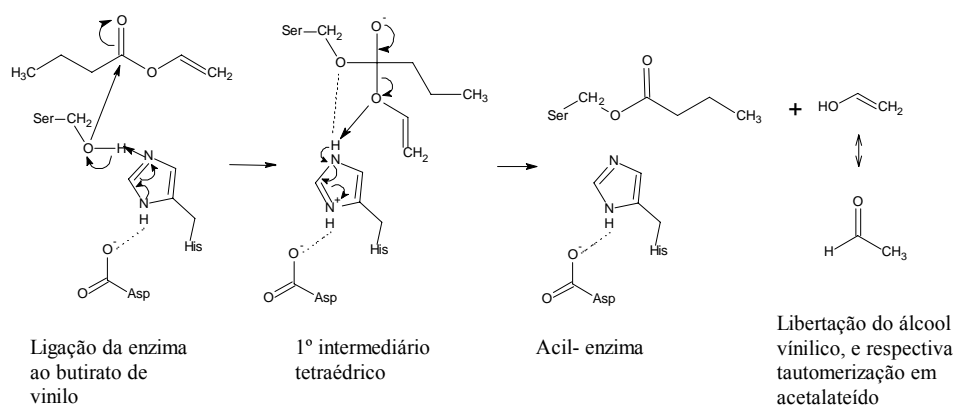
Inicialmente, o oxigénio do grupo hidroxilo da Serina ataca o átomo de carbono do grupo carbonilo do substrato. A ligação C=O do substrato transforma-se numa ligação simples e o átomo de oxigénio adquire uma carga negativa. Forma-se um estado de transição de geometria tetraédrica em torno daquele carbono, através de pontes de hidrogénio entre o oxianião e dois grupos NH de cadeias principais. Com a formação desta entidade, ocorre a transferência de um protão da Serina para a Histidina. O aspartato (o ácido aspártico tem que estar desprotonado) neutraliza em parte a carga que se desenvolve no estado de transição. A ligação carbonilo é então refeita, com o auxílio da forma protonada da Histidina que perde o protão, e dá-se o colapso do intermediário tetraédrico com expulsão de um primeiro produto (o álcool). A cadeia alquilo do primeiro substrato permanece ligada covalentemente à Serina, formando o intermediário acil enzima. Completa-se assim o passo de acilação. Seguidamente ocorre o passo de desacilação que se desenrola de



forma semelhante, mas por ordem inversa. Inicia-se assim com o ataque nucleofílico à acil-enzima, por parte do reagente álcool (na reacção de transesterificação) ou da água (na reacção de hidrólise), resultando na formação, mais uma vez com o auxílio da Histidina, de um novo intermediário tetraédrico que colapsa com libertação de um segundo produto (éster, na reacção de transesterificação, e ácido, na reacção de hidrólise). A enzima regressa ao estado inicial.

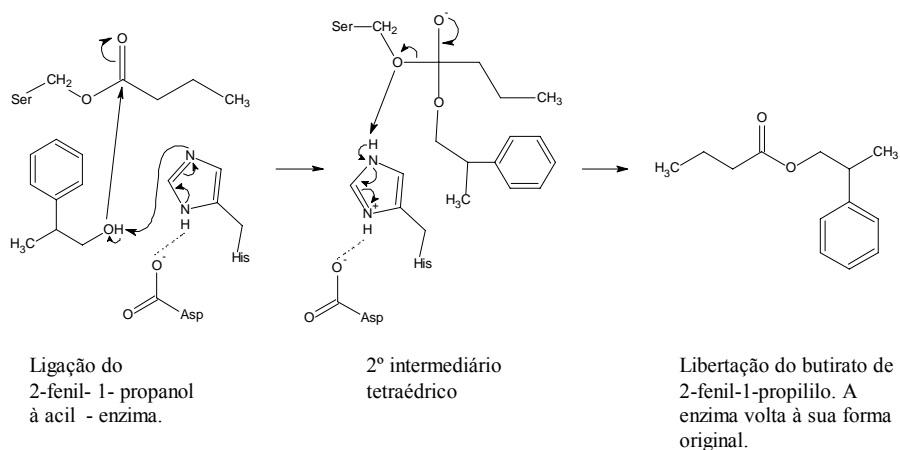
A reacção alvo utilizada nesta dissertação é a transesterificação do butirato de vinilo com o 2-fenil-1-propanol, encontrando-se na figura Fig. 2.4 esquematizada a aplicação do referido mecanismo àquela reacção.

### Acilação

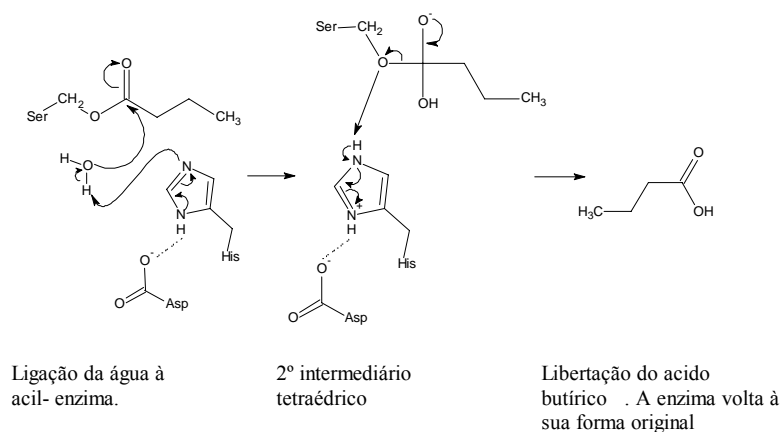


### Desacilação

#### Transesterificação



#### Hidrólise



**Fig. 2.4** Mecanismo *ping-pong bi-bi* aplicado à transesterificação do butirato de vinilo com o 2-fenil-1-propanol e à reacção secundária de hidrólise do éster substrato.

## 2.7 ENGENHARIA DE PROTEÍNAS E OUTRAS ABORDAGENS

Uma das formas de otimizar o comportamento das enzimas em meios não aquosos é o recurso a alterações do meio reaccional e/ou do suporte do biocatalisador, como se referiu atrás. A engenharia de proteínas é outra abordagem utilizada para alterar as propriedades das enzimas com vista a determinadas aplicações [Schoemaker, 2003, Hult e Berglund, 2003]. A engenharia de proteínas compreende um conjunto de técnicas que permitem modificar a sequência de aminoácidos da proteína através de alterações do gene que a codifica (mutagénese). O gene mutado é clonado e expresso num hospedeiro adequado, de forma a produzir a proteína alvo.

Existem duas estratégias principais neste tipo de abordagem: o design racional de proteínas e a evolução dirigida [Krishna, 2002, Huisman e Sligar, 2003]. O design racional de proteínas foi a primeira metodologia a ser utilizada nesta área. Tem como base a mutagénese dirigida, pelo que requer o conhecimento da estrutura da enzima. Deste ponto de vista, é muito útil a contribuição dos métodos de modelação molecular na identificação dos locais da proteína potencialmente com impacto numa determinada propriedade, e no tipo de substituições de aminoácidos a introduzir para esse fim, normalmente na vizinhança do centro activo da enzima [Ottosson et al., 2001, Ottosson et al., 2002, Soares et al., 2003, Lutz, 2004, Micaelo et al., 2005].

O facto de nem sempre a estrutura tridimensional das enzimas ser conhecida e ainda o facto de a actividade, selectividade e estabilidade das enzimas serem controladas por vários locais da proteína limita a aplicabilidade da técnica do design racional, o que levou ao desenvolvimento da técnica da evolução dirigida [Lutz e Patrick, 2004, Reetz, 2004]. Nesta abordagem, faz-se a mutagénese aleatória do gene alvo no sentido de criar diversidade molecular, testam-se os mutantes produzidos e seleccionam-se aqueles que conduzem a resultados mais promissores da propriedade enzimática em estudo. Estes mutantes são submetidos a novo processo de mutagénese aleatória, numa óptica de evolução dirigida. O número de ciclos a realizar depende dos resultados obtidos. A técnica a seleccionar depende do caso em estudo, e por vezes os melhores resultados são obtidos com a combinação do design racional e da evolução dirigida [Eggert et al., 2004].

Neste momento, dá-se também muita atenção à selecção de enzimas produzidas por microorganismos que já estão naturalmente adaptadas a funcionar em condições extremas, como por exemplo, temperaturas elevadas ou muito baixas [Georlette et al., 2003, Hoyoux et al., 2004].

## CAPÍTULO 3

### **Actividade da Cutinase em Meios Supercríticos e Orgânicos: Efeitos da Actividade da Água e da Solvatação e Efeitos Ácido-Base**

**Este capítulo foi publicado como:**

Garcia, S., Vidinha, P., Arvana, H., Gomes da Silva, M. D. R., Ferreira, M. O., Cabral, J. M. S., Macedo, E. A., Harper, N., Barreiros, S., “Cutinase activity in supercritical and organic media: water activity, solvation and acid-base effects”, *J. Supercrit. Fluid.*, 2005, 35, 62-69.



### 3 ACTIVIDADE DA CUTINASE EM MEIOS SUPERCRÍTICOS E ORGÂNICOS: EFEITOS DA ACTIVIDADE DA ÁGUA E DA SOLVATAÇÃO E EFEITOS ÁCIDO-BASE

#### 3.1 RESUMO

Realizou-se um estudo comparativo da actividade da enzima cutinase de *Fusarium solani pisi* immobilizada nos zeólitos NaA e NaY, em *n*-hexano, acetonitrilo, etano supercrítico (etano-sc) e dióxido de carbono supercrítico (CO<sub>2</sub>-sc), a duas actividades da água diferentes ( $a_w$ ) fixadas com pares de sais hidratados *in situ*, e em condições ácido-base fixadas com tampões sólidos possuindo valores de  $pK_a$  em meio aquoso entre 4,3 e 10. A reacção estudada foi a transesterificação do butirato de vinilo pelo (*R,S*)-2-fenil-1-propanol. A actividade da cutinase para a transesterificação foi mais elevada e semelhante em etano-sc e *n*-hexano, cerca de uma ordem de grandeza mais baixa em acetonitrilo e ainda mais reduzida em CO<sub>2</sub>-sc. Os coeficientes de actividade ( $\gamma$ ) calculados para os dois substratos indicam que os mesmos estão mais bem solvatados em acetonitrilo e por isso menos disponíveis para se ligarem ao centro activo da enzima do que nos outros três solventes. Os valores de  $\gamma$  sugerem ainda velocidades de reacção mais elevadas em etano-sc do que em *n*-hexano, conforme se observou experimentalmente, e evidenciam um efeito negativo directo do CO<sub>2</sub>-sc na actividade da enzima. A manipulação das condições ácido-base do meio não permitiu melhorar as velocidades iniciais de transesterificação relativamente aos brancos (ausência de tampão ácido-base, adição apenas do par de sais hidratados), excepto no caso da cutinase immobilizada no zeólito em NaA e em etano-sc, a  $a_w = 0,7$ . O mau resultado para o branco neste caso e o grande melhoramento observado na presença de um tampão básico sugerem a existência de um efeito negativo de acidez do meio que, através da realização de uma experiência sem aditivos, se confirmou não ser devido ao reconhecido carácter ácido do par de sais hidratados utilizado para fixar  $a_w = 0,7$ . Em acetonitrilo, o aumento de  $a_w$  foi acompanhado por uma diminuição das velocidades iniciais de transesterificação, ao contrário do que se observou nos outros

solventes. Registou-se uma hidrólise considerável em acetonitrilo, solvente no qual as velocidades iniciais de hidrólise aumentaram cerca de 20 vezes quando se passou de  $a_w = 0,2$  para  $a_w = 0,7$ . A hidrólise foi menos pronunciada em etano-sc e em *n*-hexano, e foi apenas observada a  $a_w = 0,7$ . Em CO<sub>2</sub>-sc, só se detectou ácido butírico após tempos de reacção muito longos, o que está de acordo com uma actividade catalítica genericamente baixa neste solvente. A enantioselectividade da cutinase relativamente ao substrato álcool foi baixa e não foi afectada por qualquer manipulação das condições do meio.

### 3.2 INTRODUÇÃO

Actualmente, as preocupações ambientais são um dos factores determinantes na opção por uma química verde, e a utilização de fluidos supercríticos (fluidos-sc) é uma boa estratégia para responder a essas preocupações [DeSimone, 2002, e Poliakoff et al., 2002]. Uma das áreas em que a utilização de fluidos-sc se afigura promissora é a biocatálise [Mesiano et al., 1999]. Hoje em dia, está firmemente estabelecido que, em meios não aquosos, as enzimas são capazes de catalisar reacções difíceis ou impossíveis de realizar em água, tornam-se mais estáveis e podem exibir uma selectividade diferente da manifestada em água [Klibanov, 2001], e já se encontram comercializadas algumas aplicações desta tecnologia [Klibanov, 2001, e Krishna, 2002]. Em meios não aquosos, a preservação da função enzimática resulta do facto de a enzima reter essencialmente a sua estrutura nativa, o que é evidenciado por estudos de raios X [Fitzpatrick et al., 1993, Yennawar et al., 1994, e Schmitke et al., 1997]. A limitação da quantidade de água disponível assegura que a enzima se mantenha cineticamente aprisionada na sua conformação nativa [Griebenow e Klibanov, 1996]. A água actua como um lubrificante molecular. E apesar de a enzima necessitar de um determinado nível de hidratação para ter uma dinâmica que lhe permita ser cataliticamente activa [Rupley et al., 1983, e Rupley et al., 1991], o aumento da hidratação para além de um certo valor pode permitir à enzima vencer a barreira energética que conduz à desnaturação.

A actividade da água ( $a_w$ ) é o parâmetro mais conveniente para correlacionar a actividade enzimática em meios não aquosos [Bell et al., 1995, e Halling, 1994]. A um valor de  $a_w$  fixo, os efeitos do solvente devidos a diferenças na partição da água são praticamente



eliminados, e a enzima deverá exibir o mesmo nível de hidratação em todos os solventes (em meios mais polares que, a valores de  $a_w$  elevados, possam competir com moléculas de água mais fracamente ligadas à enzima, esta última pode atingir níveis de hidratação comparativamente mais baixos do que o que seria de esperar a esse valor de  $a_w$ ) [Bell et al., 1997, McMinn et al., 1993]. No caso das reacções de transesterificação, e para hidrolases como a cutinase que actuam através do mecanismo da acil-enzima, o aumento de  $a_w$  afecta a competição pelo nucleófilo no passo de desacilação, o que em muitos casos deverá conduzir a um aumento das velocidades iniciais de formação do produto secundário ácido, por via da hidrólise do substrato éster. Existe geralmente uma gama de valores de  $a_w$  que conduzem a um máximo nas velocidades de transesterificação, embora factores como a imobilização da enzima e a natureza do suporte possam ter um efeito acentuado no perfil de velocidade vs.  $a_w$  observado [Valivety et al., 1994, Vidinha et al., 2004]. A valores de  $a_w$  muito baixos, um aumento de  $a_w$  deverá conduzir a um aumento da actividade da enzima através de um incremento na dinâmica da mesma [Affleck et al., 1992, Partridge et al., 1998, Toba et al., 1996]. A valores de  $a_w$  elevados, podem ocorrer fenómenos como a agregação das partículas da enzima ou uma diminuição da velocidade de passagem dos substratos através da camada de hidratação do catalisador [Vázquez Lima et al., 1995] que podem ter um impacto negativo nas velocidades iniciais de transesterificação.

A solvatação dos substratos (ou produtos) variará provavelmente de solvente para solvente, o que deverá reflectir-se na actividade da enzima [Borges de Carvalho et al., 1996, Corrêa de Sampaio et al., 1996, Fontes et al., 1998 a, Sandoval et al., 2002]. Quanto melhor o solvente solvatar as moléculas de substrato, menos disponível este estará para aceder ao centro activo da enzima [Kim, et al., 2000]. Este facto deverá dar origem a valores de  $K_m$  mais elevados (em que  $K_m$  é a constante de Michaelis–Menten para a dissociação) e ter um impacto negativo na actividade catalítica [Bell et al., 1997]. Tal como para a água, a análise da disponibilidade dos substratos requer que se tomem em linha de conta as actividades respectivas [Halling et al., 1994]. O efeito de  $a_w$  na capacidade de solvatação do solvente deverá ser tido em conta nos casos em que as alterações de  $a_w$  forem acompanhadas por alterações consideráveis da concentração da água [Bell et al., 1997], como acontece com o acetonitrilo, e não deverá ser relevante em solventes imiscíveis com

a água que saturem nesta espécie em condições de diluição infinita, como acontece com o *n*-hexano, o etano-sc ou o CO<sub>2</sub>-sc.

O solvente também pode afectar a actividade catalítica através de interacções moleculares directas solvente/enzima. A ligação de moléculas de solvente directamente no centro activo da enzima foi evidenciada por estudos de raios X [Fitzpatrick et al, 1993, Yennawar et al, 1994, Schmitke et al., 1998]. Este facto pode provocar alterações de polaridade e afectar a estabilização de estados de transição carregados [Kim et al., 2000], como os que estão envolvidos no mecanismo catalítico das hidrolases de serina, como a cutinase, que requerem que se estabeleça uma carga negativa formal no centro activo para exibirem actividade completa. A ligação de moléculas de solvente no centro activo pode também dar lugar a uma inibição competitiva com os substratos [Corrêa de Sampaio et al., 1996]. Aparentemente, não existe registo de efeitos negativos directos do *n*-hexano (ou do etano-sc) na actividade enzimática, contrariamente ao que acontece com o acetonitrilo [Bell et al., 1997] e o CO<sub>2</sub>-sc. As explicações avançadas para o efeito adverso do CO<sub>2</sub> incluem a formação de ácido carbónico na camada de hidratação da enzima, que é muito difícil de ultrapassar, mesmo a valores de  $a_w$  muito baixos [Harper e Barreiros, 2002], e a formação de carbamatos com grupos amina livres de resíduos de lisina, que é mais relevante a valores de  $a_w$  baixos e a uma basicidade elevada [Kamat et al., 1995].

O estado de protonação da enzima é outro factor que pode ter um efeito acentuado na actividade catalítica [Halling, 2000]. A imobilização da enzima num suporte é normalmente feita a partir de uma solução tampão a um pH óptimo. Neste caso, a subsequente remoção de água através da fase de vapor não causa alterações no estado de protonação dos resíduos da proteína, e as moléculas de enzima exibirão uma “memória de pH”, ou seja, “lembrar-se-ão” do pH da última solução aquosa com a qual contactaram [Zaks e Klibanov, 1985, Xu et al., 1996]. No entanto, na presença de agentes de permuta iónica ou de espécies acídicas ou básicas, podem ocorrer alterações do estado de protonação da enzima. Estas alterações podem impedir a observação do verdadeiro efeito de  $a_w$  na actividade catalítica; ou seja, uma actividade catalítica mais baixa a  $a_w$  elevado pode ser simplesmente o reflexo da produção de um produto secundário ácido no meio reaccional, cuja eliminação, com um tampão apropriado, tornaria possível que se

observasse a activação da enzima a valores de  $a_w$  elevados [Fontes et al., 2003 a]. Têm sido apresentados na literatura tampões sólidos que controlam o estado de ionização da enzima na fase não aquosa através da permuta de protões e iões estreitamente associados aos grupos ionizáveis da proteína [Harper et al., 2000, Partridge et al., 2000, Zacharis et al., 1997].

No presente trabalho, aborda-se o impacto da maioria dos efeitos descritos acima na actividade da cutinase imobilizada nos zeólitos NaA e NaY, em *n*-hexano, acetonitrilo, etano-sc e CO<sub>2</sub>-sc, na transesterificação do butirato de vinilo pelo (*R,S*)-2-fenil-1-propanol.

### 3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.3.1 Materiais

A cutinase de *Fusarium solani* pisi foi produzida a partir de uma estirpe WK-6 de *Escherichia coli* (oferecida pela Corvas International, Ghent, Bélgica) e purificada no Centro de Engenharia Biológica e Química, Instituto Superior Técnico [Carvalho et al., 1999, Lauwereys et al., 1990]. A pureza da enzima foi controlada por electroforese e focagem isoeléctrica. A actividade estereolítica da enzima (30 nM) foi determinada espectrofotometricamente a 400 nm através da hidrólise do butirato *p*-nitrofenílico (0,56 mM) em tampão fosfato de potássio de concentração 50 mM, a pH = 8,5.

O (*R,S*)-2-fenil-1-propanol (com 97 % de pureza) e os zeólitos NaA e NaY, ambos em pó, foram adquiridos à Aldrich; o butirato de vinilo (com 99 % de pureza) era da Fluka; o tridecano, o ácido 3-(ciclohexilamino)-2-hidroxi-1-propanosulfónico (CAPSO), o ácido 3-[(1,1-dimetil-2-hidroxietil)amino]-2-hidroxi-propanosulfónico (AMPSO), o ácido 3-(*N*-morfolino) propanosulfónico (MOPS), o ácido *L*-glutâmico (GLU) e os respectivos sais de sódio (CAPSO·Na, AMPSO·Na, MOPS·Na, GLU·Na) eram da Sigma; o *n*-hexano, o acetonitrilo, o hidrogenofosfato dissódico, o hidrogenofosfato dissódico dihidratado, o hidrogenofosfato dissódico heptahidratado, o carbonato de sódio, o bicarbonato de sódio e o cloreto de sódio eram da Merck; o acetato de potássio e os reagentes de Karl-Fischer Hydranal Coulomat A e C eram da Riedel de Hæan. O butirato de (*R,S*)-2-fenil-1-propilo foi preparado como se descreve em Vidinha et al. [2004]. Os solventes orgânicos, os

substratos e o tridecano foram armazenados na presença de peneiros moleculares (com orifícios de 3 Å, da Merck). O etano, o CO<sub>2</sub> e o azoto foram fornecidos pela Air Liquide e tinham uma pureza indicada superior a 99.95 mol % (etano) e 99.995 mol %..

### 3.3.2 Imobilização da enzima

A cutinase foi imobilizada por deposição segundo o método desenvolvido por Gonçalves et al. [1996], e Serralha et al. [1998]. Dissolveu-se a enzima liofilizada numa solução de fosfato de sódio de concentração 50 mM (com uma concentração de enzima de 10 mg mL<sup>-1</sup>), a pH 8,5. Adicionou-se o suporte à solução (na proporção 25 mg de cutinase por g de suporte) e, depois de se misturar em vortex durante 1 min, secou-se a preparação sob vácuo durante pelo menos 24 h. O rendimento médio de imobilização foi de (51 ± 8) % para o zeólito NaA e de (72 ± 12) % para o zeólito NaY, conforme se determinou com um método de Lowry modificado [Lowry et al., 1951].

### 3.3.3 Ensaio enzimáticos

Para as reacções em fluidos-sc, utilizaram-se células de aço inox de volume variável (volume de reacção de aproximadamente 12 cm<sup>3</sup>), equipadas com uma janela de safira e com válvulas para enchimento da célula e para amostragem. Os detalhes da instalação de alta pressão e da técnica experimental foram referidos por Fontes et al. [2001 b]. Todas as reacções realizadas em solventes orgânicos foram feitas em frascos fechados de polipropileno (volume reaccional de 3,5 cm<sup>3</sup>). Os pares de sais hidratados utilizados (42 g L<sup>-1</sup> de cada elemento do par) e os valores de  $a_w$  que fixam a 35 °C (Halling, 1992) foram: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2/0 ( $a_w$  = 0,19), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7/2 ( $a_w$  = 0,69). No caso do acetonitrilo, ajustou-se  $a_w$  antes da adição dos pares de sais hidratados (a quantidade de água necessária foi calculada a partir dos dados fornecidos por Bell et al. [1997]). Os tampões ácido-base sólidos foram utilizados nas concentrações 11 g L<sup>-1</sup> (forma básica) e 3 g L<sup>-1</sup> (forma ácida). A reacção estudada foi a transesterificação do butirato de vinilo (170 mM) pelo (*R,S*)-2-fenil-1-propanol (25 mM). Equilibraram-se sempre as preparações de enzima com todos os outros componentes sólidos presentes na fase não aquosa (solvente, (*R,S*)-2-fenil-1-propanol e tridecano) durante 2 h, tempo considerado suficiente para a partição de água e a transferência de iões, antes de se adicionar o butirato de vinilo para dar início à reacção.

Utilizou-se o tridecano (27 mM) como padrão interno para análise por cromatografia gasosa (GC). As misturas reacionais foram agitadas com uma barra de agitação magnética. A concentração da água foi medida em todos os solventes por titulometria de Karl-Fischer. Nos fluidos-sc, os valores de  $a_w$  foram calculados dividindo a concentração da água na mistura reacional pela concentração da água na mesma mistura na saturação [Fontes et al., 2002]. As reacções em fluidos-sc foram realizadas em circuito fechado, contrariamente ao que se verificou com solventes orgânicos. Este facto pode explicar a interferência observada do acetaldeído (resultante do álcool vinílico) nas medições de Karl-Fischer realizadas no decurso da reacção que, por esse motivo, foram abandonadas. Para se atingir  $a_w = 0,7$  nas experiências feitas em etano-sc na ausência de tampões ácido-base ou de pares de sais hidratados, adicionou-se a etano-sc a quantidade de água necessária para o efeito, numa outra célula montada antes do reactor contendo a enzima, a fim de evitar efeitos de histerese na hidratação da mesma [Fontes et al., 2001 a] e/ou agregação. A enzima foi sempre pré-equilibrada através da fase de vapor com soluções saturadas de sais a 25 °C, durante cerca de 3 dias, para atingir os valores de  $a_w = 0,22$  (com acetato de potássio) e  $a_w = 0,75$  (com cloreto de sódio), retirados da literatura [Greenspan, 1977].

### 3.3.4 Métodos de análise

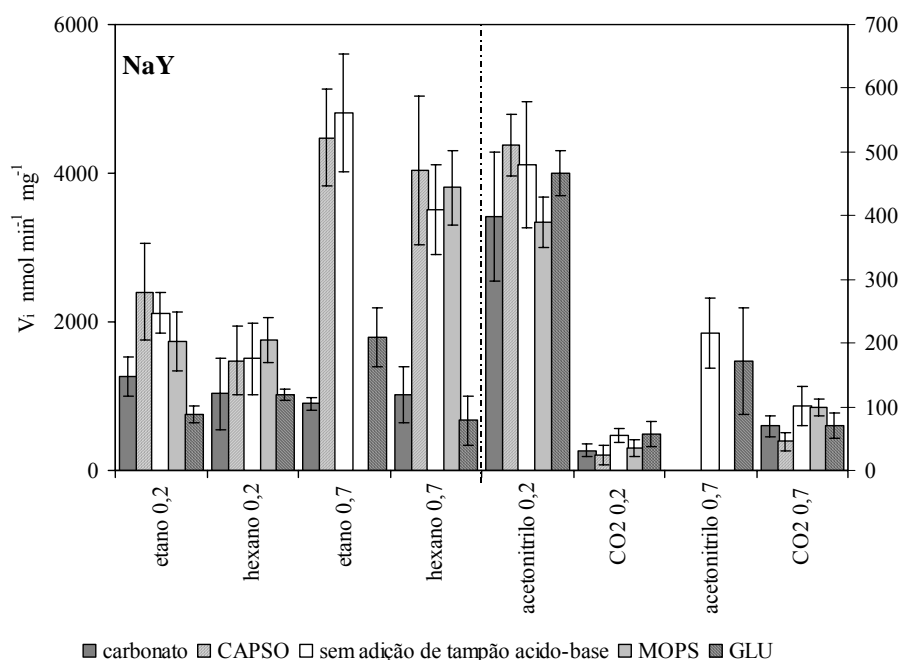
Quer a conversão, quer o excesso enantiomérico do substrato álcool não reagido (e.e.<sub>s</sub>) foram medidos por GC, num cromatógrafo gasoso da série Trace 2000 da Unicam. Condições de análise: coluna capilar não comercial de sílica fundida com 30 m × 0,32 mm (diâmetro interno), revestida com um filme de 0,25 µm de espessura de heptakis-(2,3-di-*O*-metil-6-*O*-*terc*-butildimetilsilil)-β-ciclodextrina (15 %) em SE 52 (DiMe); programa de forno: 90 °C durante 5 min, rampa 90-136 °C a 0,8 °C min<sup>-1</sup>, 200 °C durante 5 min; temperatura de injeção, 250 °C; temperatura do detector de ionização de chama (FID), 250 °C; gás de arraste, hélio (2,0 cm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup>); razão de split, 20:1. Não se detectaram produtos nos ensaios efectuados sem a presença de enzima. A razão enantiomérica, *E*, foi calculada através da expressão  $E = \{\ln[(1-c)(1-e.e.s)]\} / \{\ln[(1-c)(1+e.e.s)]\}$ , em que *c* é a conversão e e.e.<sub>s</sub> é relativo ao enantiómero (*R*), a partir de dados obtidos para o substrato racémico no decurso da reacção (sempre que possível, para conversões até 0,5).

### 3.3.5 Coeficientes de actividade

Os coeficientes de actividade na convenção simétrica,  $\gamma$ , ( $\gamma = a/x$ , em que  $a$  é a actividade e  $x$  é a fracção molar), para os substratos nos solventes orgânicos foram calculados utilizando uma modificação [Larsen et al., 1987] do método de contribuição de grupos UNIFAC, e os valores de  $\gamma$  para os substratos nos fluidos-sc foram calculados utilizando a equação de estado de contribuição de grupos MHV2 (aproximação de segunda ordem à regra de mistura de Huron–Vidal) [Dahl et al., 1990, Dahl et al., 1991]. Nestes cálculos não se tomou em linha de conta nem enzima, nem aditivos.

## 3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

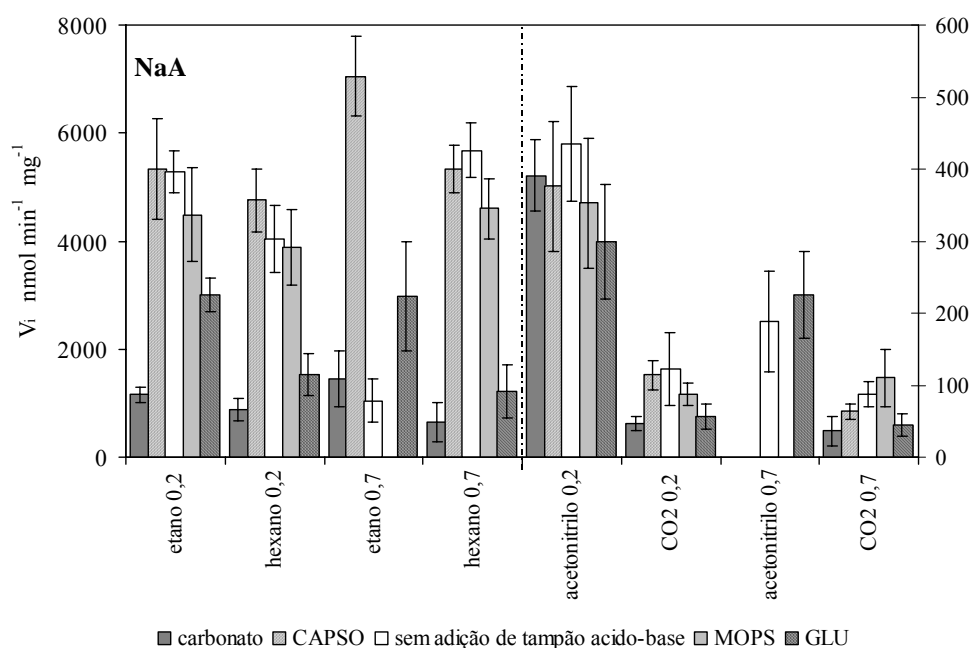
As velocidades iniciais de transesterificação do butirato de vinilo pelo (R,S)-2-fenil-1-propanol foram semelhantes em etano-sc e em n-hexano e consideravelmente mais elevadas do que em acetonitrilo e em CO<sub>2</sub>-sc, em todas as condições testadas (Fig. 3.1 e Fig. 3.2). Para além de se ter controlado  $a_w$  em todas as experiências, também se assegurou o controlo do estado de protonação dos grupos ácidos da enzima, através da utilização de tampões ácido-base que fixam o parâmetro pH-pNa [Halling, 2000]. As excepções foram os brancos (ausência de tampão ácido-base, adição apenas do par de sais hidratados). No entanto, verificou-se com um indicador que os pares de sais hidratados utilizados no presente estudo para controlar  $a_w$  também podem ter efeitos ácido-base nas enzimas em solventes não-aquosos [Fontes et al., 2003 b, Peres et al., 2005], embora quando em presença de tampões ácido-base sólidos seja a acção destes últimos que prevaleça. Assim, os brancos reflectem a acidez relativa dos pares de sais Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2/0 e Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7/2. O par Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2/0 conduziu a leituras do indicador semelhantes às obtidas na presença do tampão MOPS [Harper et al., 2000, Harper e Barreiros, 2002]. O par Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7/2 é muito mais ácido e protonou completamente o indicador [Fontes et al., 2003 a, Peres et al., 2005]. Este facto também ocorreu na presença do tampão GLU [Harper et al., 2000], e portanto o indicador não consegue distinguir aqueles dois aditivos.



**Fig. 3.1** Efeito dos tampões ácido-base sólidos e de  $a_w$  nas velocidades iniciais de transesterificação da cutinase imobilizada no zeólito NaY, em fluidos-sc e solventes orgânicos. O eixo esquerdo dos yy refere-se ao etano-sc e ao n-hexano (dados do lado esquerdo da linha a tracejado). pKa em meio aquoso dos tampões (25°C): 10,3 ( $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ ), 9,6 (CAPSO/CAPSO·Na), 7,2 (MOPS/MOPS·Na), 4,3 (GLU/GLU·Na). T = 35 °C. P = 100 bar (fluidos-sc). [2-fenil-1-propanol] = 25 mM. [butirato de vinilo] = 170 mM. [preparação enzimática]: 1 g L<sup>-1</sup> ou 4 g L<sup>-1</sup> (CO2-sc).

Em etano-sc e em n-hexano, a cutinase imobilizada quer no zeólito NaY, quer no zeólito NaA exibiu uma actividade de transesterificação mais elevada na presença de tampões ácido-base de basicidade intermédia, tendo os tampões carbonato e GLU, aos quais correspondem os valores de pKa extremos, conduzido a velocidades de reacção mais baixas. Sabe-se que a cutinase funciona melhor para estados de protonação inicial estabelecidos por um pH de imobilização entre 7 e 8,5 [Gonçalves et al., 1996, Serralha et al., 1998]; seleccionou-se o valor de 8,5 para o presente trabalho. Num estudo anterior, verificou-se que quando a cutinase era imobilizada a pH 5, exibia apenas uma actividade marginal que aumentava na presença de tampões ácido-base [Vidinha et al., 2004]. Este facto indica claramente que a cutinase tem memória de pH, e sugere que o pKa em meio aquoso do tampão GLU (4,3) muito provavelmente não traduz o comportamento deste

tampão em meios não aquosos [Fontes et al., 2003 b], ou seja, aquele valor de pKa sugere uma acidez mais elevada do que a que este tampão realmente confere. Mesmo assim, a cutinase é menos sensível às alterações do estado de protonação dos seus resíduos ácidos do que a subtilisina [Partridge et al., 2000, Fontes et al., 2002, Fontes et al., 2003 b]. A incapacidade dos tampões em aumentarem as velocidades iniciais da reacção relativamente aos brancos que aqui se observou com a cutinase pode ser devida ao facto de a enzima ter sido imobilizada a um pH óptimo, tal como foi sugerido para explicar resultados semelhantes obtidos com a subtilisina imobilizada [Partridge et al., 2000] e com a papaína imobilizada [Theppakorn et al., 2003]. Mas tal como foi observado por Partridge et al. [2000], mesmo nesta situação a utilização dos tampões pode ser vantajosa, na medida em que o estado de ionização da enzima permanecerá constante durante a reacção, independentemente da produção de espécies ácidas ou básicas.



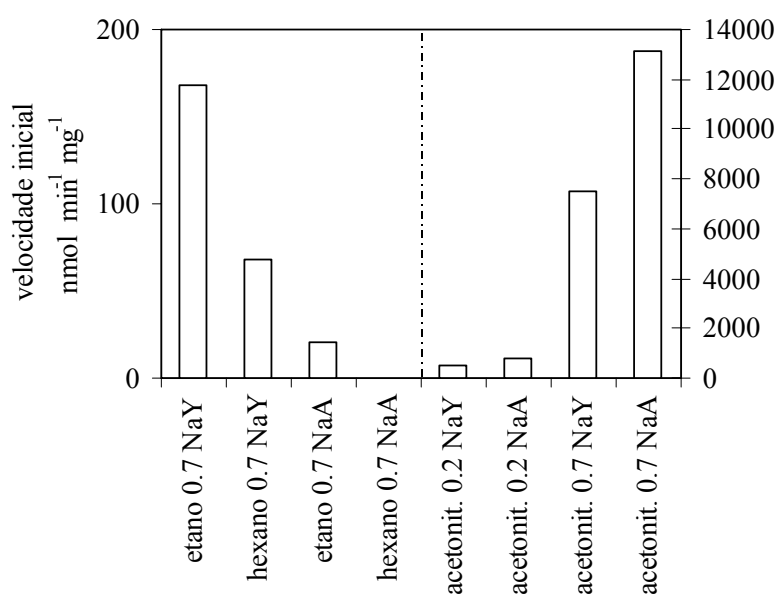
**Fig. 3.2** Efeito dos tampões ácido-base sólidos e de  $a_w$  nas velocidades iniciais de transesterificação da cutinase imobilizada no zeólito NaA, em fluidos-sc e solventes orgânicos. O eixo esquerdo dos yy refere-se ao etano-sc e ao *n*-hexano (dados do lado esquerdo da linha a tracejado).

Os resultados obtidos para a cutinase com os brancos a valores de  $a_w$  baixos são muito semelhantes aos que se obtiveram com o tampão MOPS aos mesmos valores de  $a_w$ , quer



devido à semelhança da acidez relativa do tampão MOPS e do par de sais  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2/0$ , quer devido apenas à ausência de discriminação que a cutinase revelou quando exposta a tampões ácido-base de valores de  $\text{pK}_a$  em meio aquoso na gama 9,6-7,2. A situação alterou-se ligeiramente a valores de  $a_w$  elevados. Existe informação na literatura no sentido de que, quer o tampão MOPS, quer o tampão CAPSO formam hidratos a valores de  $a_w$  superiores a 0,23 e 0,53, respectivamente [Harper et al., 2000]. A  $a_w$  controlado, como acontece no presente estudo, a formação daqueles hidratos pode conduzir a valores de  $\text{pH-pNa}$  um pouco diferentes dos assegurados pelas formas anídricas dos dois elementos do tampão. No entanto, esses valores não deverão variar de solvente para solvente, e portanto os tampões deverão continuar a funcionar como tal. Apesar disso, não foi possível medir velocidades iniciais a  $a_w$  elevada em acetonitrilo na presença dos tampões MOPS ou CAPSO. O tampão MOPS também não funcionou bem em etano-sc a  $a_w$  elevada, apesar de o seu funcionamento ter sido normal em n-hexano ao mesmo valor de  $a_w$ , e de ter proporcionado velocidades mais elevadas do que as obtidas com o tampão GLU. Quando se utilizou a cutinase imobilizada no zeólito NaY, obtiveram-se velocidades muito mais elevadas na presença do par de sais  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7/2$  sem mais aditivos (branco) do que na presença do tampão GLU, quer em etano-sc, quer em n-hexano. Este facto pode ser devido à menor acidez do par de sais  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7/2$  relativamente ao tampão GLU, ou a uma capacidade limitada do par de sais para permutar  $\text{H}^+$  e  $\text{Na}^+$ , o que não é de estranhar dado que não se trata de um tampão. É de referir que, para além da enzima, também o zeólito que representa a maior parte da preparação enzimática participa em todos os processos de permuta iónica. Já quando se utilizou a cutinase imobilizada no zeólito NaA a  $a_w$  elevado, verificou-se um abaixamento apreciável da actividade de transesterificação no branco em etano-sc. O facto de o tampão CAPSO ou mesmo o tampão GLU conseguirem aumentar a actividade da enzima sugere que o fenómeno responsável pela queda de actividade no branco era de natureza ácido-base. Em experiências realizadas em etano-sc sem a adição de tampão ácido-base nem do par de sais hidratos, nas quais se ajustou independentemente  $a_w$  do solvente e da enzima a um valor de 0,7, obtiveram-se velocidades iniciais de transesterificação semelhantes ( $1341 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ) às indicadas na Fig. 3.2. Este facto confirma que o par de sais  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7/2$  não é o agente responsável pela queda de actividade da enzima, como aliás indiciam os resultados obtidos para todos os brancos a  $a_w = 0,7$ , excepto no caso específico da cutinase imobilizada no zeólito NaA em etano-sc.

Uma causa possível para o aumento de acidez nos brancos é a reacção de hidrólise. Tal como foi demonstrado por Vidinha et al. [2004], na presença dos tampões mais básicos o ácido butírico precipita como butirato de sódio e não pode ser quantificado por análise de GC de rotina. No presente estudo, a quantificação do ácido butírico foi apenas efectuada nos brancos e nos ensaios realizados na presença dos tampões MOPS e GLU. Os níveis de hidrólise registados foram semelhantes em etano-sc e em *n*-hexano, e mais acentuados quando se utilizou a cutinase imobilizada no zeólito NaY (Fig. 3.3). A valores de  $a_w$  baixos, não se detectou ácido butírico dentro do erro experimental associado à quantificação desta espécie durante o período de medição das velocidades de transesterificação. A valores de  $a_w$  elevados, detectaram-se níveis baixos de ácido butírico no meio reaccional quando se utilizou a cutinase imobilizada no zeólito NaA, o que não ajuda a esclarecer a queda de actividade observada em etano-sc relativamente ao *n*-hexano



**Fig. 3.3** Velocidades iniciais da hidrólise em fluidos-sc e em solventes orgânicos. O eixo do yy esquerdo foi usado para o etano-sc e *n*-hexano (dados do lado esquerdo da linha a tracejado).

Os resultados obtidos em acetoneitrilo estão em bom acordo com os obtidos por Vidinha et al. [2004]. Contrariamente ao que se observou em etano-sc e em *n*-hexano, em acetoneitrilo um aumento de  $a_w$  foi acompanhado por uma diminuição da actividade de

transesterificação; ainda, a valores de  $a_w$  baixos a actividade da enzima foi semelhante para os dois zeólitos, tendo-se registado mais hidrólise no caso do zeólito NaA. Em acetonitrilo, a enzima mostrou-se claramente insensível às condições ácido-base do meio que se devem ter alterado muito nos brancos e nos ensaios realizados na presença do tampão GLU. De facto, foi em acetonitrilo que se registaram as velocidades de hidrólise mais elevadas. Em  $\text{CO}_2\text{-sc}$ , a actividade da enzima foi baixa quando comparada com os outros solventes, circunstância muito frequente quando se trabalha com hidrolases naquele meio [Borges de Carvalho et al., 1996, Fontes et al., 1998 a, Fontes et al., 2001 a, Fontes et al., 2002]. Já se referiram anteriormente causas possíveis para o efeito negativo do  $\text{CO}_2\text{-sc}$  na actividade enzimática. Neste solvente, o efeito de  $a_w$  nas velocidades de transesterificação foi semelhante ao observado em etano-sc e em n-hexano. Só se detectou hidrólise após tempos de reacção muito longos, o que está de acordo com uma actividade catalítica genericamente baixa da cutinase em  $\text{CO}_2\text{-sc}$ .

Utilizaram-se concentrações dos substratos baixas (as fracções molares variaram entre cerca de  $1\text{E-}03$  e  $3\text{E-}03$ , no caso do álcool, e entre cerca de  $7\text{E-}03$  e  $2\text{E-}02$ , no caso do éster) e os coeficientes de actividade correspondentes deverão estar muito próximos dos valores limite respectivos a diluição infinita,  $\gamma^\infty$ . São dados na Tabela 3.1 os valores de  $\gamma^\infty$  calculados para cada substrato nos quatro solventes.

**Tabela 3.1** Coeficientes de actividade a diluição infinita calculados para as misturas binárias (soluto + solvente).

| Soluto             | Solvente                | $\ln \gamma_{\text{soluto}}^\infty$ |
|--------------------|-------------------------|-------------------------------------|
| 2 fenil-1-propanol | Etano-sc                | 3,86                                |
|                    | n-hexano                | 2,74                                |
|                    | Acetonitrilo            | 0,902                               |
|                    | $\text{CO}_2\text{-sc}$ | 4,51                                |
| Butirato de Vinilo | Etano-sc                | 2,46                                |
|                    | n-hexano                | 1,11                                |
|                    | Acetonitrilo            | 0,824                               |
|                    | $\text{CO}_2\text{-sc}$ | 1,55                                |
| Ácido Butírico     | Etano-sc                | 3,01                                |
|                    | n-hexano                | 1,88                                |

Esta tabela evidencia de forma clara o efeito negativo do CO<sub>2</sub>-sc na actividade da cutinase. Os dados de  $\gamma^\infty$  mostram que a partição dos substratos do solvente para o centro activo da enzima é mais favorável em CO<sub>2</sub>-sc do que em *n*-hexano e em acetonitrilo. Actividades dos substratos mais elevadas sugerem velocidades de reacção mais elevadas, contrariamente ao que foi observado. Assim, o CO<sub>2</sub>-sc não tem sobre a cutinase um efeito negativo indirecto, mediado por diferenças de solvatação, mas antes um efeito directo muito acentuado. É em acetonitrilo que os substratos estão mais bem solvatados e menos disponíveis para a reacção. Verifica-se também uma solvatação mais eficiente em *n*-hexano do que em etano-sc, o que concorda em termos qualitativos com a tendência observada nas velocidades iniciais de transesterificação. A presença do segundo substrato não afecta o valor de  $\gamma$  para o outro substrato de forma significativa, dadas as baixas concentrações envolvidas. Pelas mesmas razões, o impacto de  $a_w$  nos valores de  $\gamma$  para os dois substratos é muito pequeno nos solventes que saturam com concentrações de água muito baixas. Em acetonitrilo, no entanto, o aumento de  $a_w$  para 0,7 é acompanhado por uma diluição apreciável do solvente. Comparando os valores de  $\gamma$  calculados para as misturas quaternárias (Tabela 3.2) com os valores de  $\gamma$  calculados para as misturas binárias, verifica-se uma tendência semelhante no que diz respeito ao impacto da água nos valores de  $\gamma$  para os substratos, excepto no caso do substrato éster em acetonitrilo. No entanto, o aumento verificado no valor de  $\gamma$  é pequeno. Assim, a diminuição das velocidades de transesterificação com o aumento de  $a_w$ , que se observou apenas em acetonitrilo, deverá reflectir um aumento da competição da água com os substratos para a ligação ao centro activo da enzima, manifestado em velocidades de hidrólise mais elevadas do que nos outros três solventes. Pensa-se que a acção da água como inibidor competitivo contribui para o aumento observado dos valores de  $K_m$  dos substratos quando se aumenta o valor de  $a_w$  [Bell et al., 1997].

**Tabela 3.2** Coeficientes de actividade calculados para as misturas quaternárias a  $a_w = 0,7$ .

| Mistura             | Fracção Molar | $\ln \gamma$ |
|---------------------|---------------|--------------|
| Etano-sc            | 9,82E-01      | 2,7E-03      |
| Água                | 8,10E-04      | 6,8          |
| 2-fenil-1-propanol  | 2,27E-03      | 3,4          |
| Butirato de Vinilo  | 1,54E-02      | 2,2          |
| <i>n</i> -Hexano    | 9,75E-01      | 1,70E-03     |
| Água                | 3,97E-04      | 7,47         |
| 2-fenil-1-propanol  | 3,20E-03      | 2,52         |
| Butirato de Vinilo  | 2,18E-02      | 1,00         |
| Acetonitrilo        | 8,05E-01      | 5,45E-02     |
| Água                | 1,87E-01      | 1,32         |
| 2-fenil-1-propanol  | 1,06E-03      | 0,89         |
| Butirato de Vinilo  | 7,23E-03      | 1,13         |
| CO <sub>2</sub> -sc | 9,83E-01      | 3,10E-03     |
| Água                | 2,66E-03      | 5,57         |
| 2-fenil-1-propanol  | 1,83E-03      | 3,82         |
| Butirato de Vinilo  | 1,24E-02      | 1,18         |

[2-fenil-1-propanol] = 25 mM; [butirato de vinilo] = 170 mM.

A enantioselectividade da cutinase relativamente ao substrato álcool foi muito baixa (valores de E entre 1 e 2), em todas as condições reaccionais testadas.

### 3.5 CONCLUSÃO

A  $a_w$  constante, as diferenças de actividade enzimática observadas em vários solventes podem simplesmente reflectir diferenças de solvatação, o que pode ser elucidado através do cálculo das actividades dos substratos, tal como foi efectuado no presente estudo. Curiosamente, em etano-sc e em *n*-hexano os tampões ácido-base com os valores de  $pK_a$  em meio aquoso mais alto e mais baixo conduziram a velocidades iniciais de transesterificação do butirato de vinilo pelo (*R,S*)-2-fenil-1-propanol mais baixas do que as obtidas com tampões de basicidade intermédia, enquanto em acetonitrilo a actividade da cutinase não foi sensível às alterações das condições ácido-base do meio. Estas diferenças na sensibilidade da actividade da cutinase aos tampões ácido-base podem estar relacionadas com as diferenças de polaridade dos solventes. Não existe uma explicação óbvia para a velocidade de transesterificação comparativamente baixa que foi obtida no branco para a cutinase imobilizada no zeólito NaA, em etano-sc. O facto de a actividade da enzima ter sido elevada na presença de tampões com capacidade para trocar  $Na^+$  com  $H^+$  sugere que o ácido butírico formado no branco pode ser a causa da diminuição de actividade. É razoável esperar que este produto secundário tenha uma difusividade mais elevada em etano-sc do que em *n*-hexano, o que parece ir contra o que se observou experimentalmente. No entanto, o valor mais elevado de  $\gamma$  para o ácido butírico em etano-sc do que em *n*-hexano (Tabela 3.1) e consequentemente uma maior disponibilidade do ácido para a enzima em etano-sc pode, pelo menos em parte, explicar o comportamento observado, que também deve estar relacionado com o tipo de suporte. De facto, a imobilização da cutinase no zeólito NaA ou no zeólito NaY é efectuada em condições que não saturam a superfície do suporte [Gonçalves et al., 1996]. Além disso, o rendimento de imobilização da cutinase no zeólito NaA é mais baixo do que no zeólito NaY. Deverá portanto haver um número comparativamente maior de locais disponíveis para a ligação dos solutos à superfície do zeólito NaA. Uma vez que o zeólito NaA é o mais hidrofóbico dos dois zeólitos, o ácido butírico deverá ter maior afinidade para os locais disponíveis à superfície deste zeólito do que para os locais disponíveis à superfície do zeólito NaY.

## **AGRADECIMENTOS**

Este trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia através dos contratos PRAXIS/P/BIO/14314/1998 e POCTI/35429/QUI/2000 e a bolsa PRAXIS XXI/BD/21615/99 (S. Garcia), e pelo FEDER. Agradece-se o apoio do Ricardo Baptista na produção da cutinase.





## **CAPÍTULO 4**

### **Estudo Comparativo de Biocatálise em Solventes Não-Convencionais: Líquidos Iônicos, Fluidos Supercríticos e Meio Orgânico**

**Este capítulo foi publicado como:**

Garcia S., Lourenço, N. M. T., Lousa D., Sequeira, A. F., Mimoso P., Cabral, J. M. S., A. M. A. Carlos, e Barreiros, S.,. “A comparative study of biocatalysis in non-conventional solvents: Ionic liquids, supercritical fluids and organic media”, *Green Chem.*, 2004 , 6, 466-470.



## 4 ESTUDO COMPARATIVO DE BIOCATÁLISE EM SOLVENTES NÃO-CONVENCIONAIS: LÍQUIDOS IÔNICOS, FLUIDOS SUPERCRÍTICOS E MEIO ORGÂNICO

### 4.1 RESUMO

Mediram-se as actividades catalíticas da cutinase imobilizada no zeólito NaY e da lipase B de *Candida antarctica* imobilizada numa resina acrílica (Novozym 435) numa reacção modelo de transesterificação em três líquidos iónicos (LIs) contendo como catião o ião imidazólio, em etano supercrítico (etano-sc), CO<sub>2</sub>-sc e *n*-hexano, a valores de actividade da água ( $a_w$ ) de 0,2 e 0,7. A actividade de transesterificação da cutinase foi mais elevada e semelhante em 1-*n*-butil-3-metilimidazólio hexafluorofosfato ([C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>]), etano-sc e *n*-hexano, mais de uma ordem de grandeza inferior em CO<sub>2</sub>-sc, e aumentou com o aumento de  $a_w$ . Não se detectou hidrólise em fluidos-sc e em *n*-hexano. Em LIs, observou-se hidrólise apenas a  $a_w = 0,7$ . Quer as velocidades iniciais de transesterificação, quer de hidrólise da Novozym diminuíram com o aumento de  $a_w$ . O CO<sub>2</sub>-sc não teve um efeito negativo na actividade desta enzima que foi tão elevada em CO<sub>2</sub>-sc quanto em etano-sc e em *n*-hexano. As velocidades de reacção baixas registadas neste caso nos LIs sugerem a existência de limitações difusionais internas que não se verificam no caso da preparação de cutinase, na qual a enzima se encontra adsorvida apenas à superfície do suporte. O CO<sub>2</sub>-sc não afectou de forma negativa a actividade catalítica da cutinase suspensa em [C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>], o que sugere um efeito protector do LI. No caso da Novozym, obteve-se um aumento acentuado da velocidade de transesterificação no sistema [C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>]/CO<sub>2</sub>-sc, relativamente ao [C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>] sozinho. Este facto pode reflectir um melhoramento da transferência de massa dos solutos para os poros da matriz de imobilização, devido à elevada concentração de CO<sub>2</sub> dissolvido e à redução da viscosidade do LI.

## 4.2 INTRODUÇÃO

A utilização de líquidos iônicos (LIs) ou de fluidos supercríticos (fluidos-sc) pode ser uma boa estratégia no sentido da exigência, cada vez maior, da introdução de tecnologias limpas nos processos industriais [DeSimone, 2002]. Os LIs não têm pressão de vapor mensurável e os fluidos-sc podem ser facilmente eliminados por simples descompressão. Para além de irem ao encontro de preocupações ambientais, os LIs e os fluidos-sc têm propriedades consideradas originais face aos solventes mais convencionais. Essas propriedades, que conduziram à designação de solventes “neotéricos” [Seddon, 1996, Wilkes, 2002], estão na base do potencial que é reconhecido a estes solventes para competirem com os solventes mais convencionais a nível de aplicações industriais.

Os primeiros trabalhos sobre biocatálise em fluidos-sc [Randolph et al., 1985, Hammond et al., 1985, Nakamura et al., 1986] foram publicados logo depois do artigo que, há vinte anos atrás [Zaks e Kliblanov, 1984], despoletou o interesse desde então crescente na biocatálise em meios não aquosos. Os primeiros trabalhos sobre biocatálise envolvendo um LI apareceram muito mais recentemente, e descrevem a utilização de um LI como meio de dispersão de uma enzima para uma reacção de catálise [Erbeldinger et al., 2000] e como meio não aquoso num sistema bifásico água-LI com células inteiras [Cull et al., 2000]. O número de publicações semelhantes tem vindo a aumentar continuamente, conforme se pode ver em artigos de revisão recentes [Sheldon et al., 2002, Rantwijk et al., 2003]. De facto, as vantagens proporcionadas pela utilização de enzimas em solventes orgânicos também se verificam nos LIs. A escolha do solvente, um aspecto importante da abordagem de engenharia de meio à biocatálise em meios não aquosos pode, no caso dos LIs, ser ainda mais livre já que pode envolver a concepção do próprio LI [Freemantle, 2001]. Entre os desenvolvimentos recentes neste domínio, inclui-se a concepção de LIs quirais, funcionalizados ou sintetizados a partir de fontes renováveis [Handy, 2003, Davis e Fox, 2003, Ishida et al., 2002, Branco et al., 2002]. O aspecto importante da toxicologia dos LIs está também a ser investigado com vista ao desenvolvimento sustentável de tecnologia baseada em LIs [Jastorff et al., 2003].

A combinação de LIs com fluidos-sc pode ser um meio de evitar a utilização de solventes orgânicos para extrair solutos de LIs [Blanchard et al., 1999, Blanchard et al., 2001, Scurto

et al., 2002]. Estudos de diagramas de fase de sistemas binários do tipo LI-CO<sub>2</sub> com alguns dos LIs mais comuns mostrou que esses LIs não expandiam de forma apreciável mesmo quando continham grandes quantidades de CO<sub>2</sub> dissolvido e que, apesar disso, a solubilidade do LI na fase rica em CO<sub>2</sub> estava abaixo dos limites de detecção [Blanchard e Brennecke, 2001]. Uma solubilidade elevada do fluido-sc no LI facilita o contacto do fluido-sc com os solutos de interesse, e além disso reduz a viscosidade do LI, melhorando assim a transferência de massa. Os sistemas do tipo LI-CO<sub>2</sub> têm sido aplicados com sucesso na síntese química [Bortolini et al., 2003, Kawanam et al., 2003], na catálise homogénea e bifásica [Webb et al., 2003, Najdanovic-Visak et al., 2003, Bösmann et al., 2001, Brown et al., 2001], e na biocatálise [Laszlo, 2001, Lozano et al., 2002, Reetz et al., 2002, Lozano et al., 2003, Reetz et al., 2003]. O estudo efectuado por Reetz et al. [Reetz et al., 2003] demonstra bem o potencial que existe na combinação da biotransformação num LI com a extracção com CO<sub>2</sub>-sc num processo de reacção/separação eficiente, realizado em condições ambientalmente benignas.

A cutinase é uma enzima versátil que catalisa reacções de síntese e de hidrólise com uma larga gama de substratos. A cutinase tem sido aplicada como enzima lipolítica em detergentes, para remover gorduras. Outras aplicações incluem a hidrólise da gordura do leite na indústria de lacticínios, e a síntese de triglicéridos com determinadas estruturas [Carvalho et al., 1999]. A lipase B de *Candida antarctica* é provavelmente a lipase mais utilizada em biocatálise. Esta enzima tem sido aplicada na produção de sabões, cremes e lubrificantes, através de reacções de esterificação [Krishna, 2002], e tem-se revelado um excelente biocatalisador para a resolução de álcoois secundários [Orrenius et al., 1998]. No presente estudo, comparam-se as actividades da cutinase imobilizada no zeólito NaY e da lipase B de *Candida antartica* imobilizada numa resina acrílica macroporosa (Novozym 435), a valores de actividade da água (aw) constantes, em três classes de solventes: os LIs 1-*n*-butil-3-metilimidazólio hexafluorofosfato ([C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>]), 1-*n*-octil-3-metilimidazólio hexafluorofosfato ([C<sub>8</sub>mim][PF<sub>6</sub>]) e 1-*n*-butil-3-metilimidazólio tetrafluoroborato ([C<sub>4</sub>mim][BF<sub>4</sub>]), etano-sc e CO<sub>2</sub>-sc, e *n*-hexano, um solvente orgânico vulgarmente utilizado. Também se explora a combinação de [C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>] com CO<sub>2</sub>-sc num reactor contínuo.

## 4.3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.3.1 Materiais

A cutinase de *Fusarium solani pisi* foi produzida a partir de uma estirpe WK-6 de *Escherichia coli* (oferecida pela Corvas International, Ghent, Bélgica) e purificada no Centro de Engenharia Biológica e Química, Instituto Superior Técnico [Carvalho et al., 1999, Lauwereys et al., 1990]. A lipase B de *Candida antarctica* imobilizada foi gentilmente cedida pela Novo Nordisk Bioindustrial, Espanha.

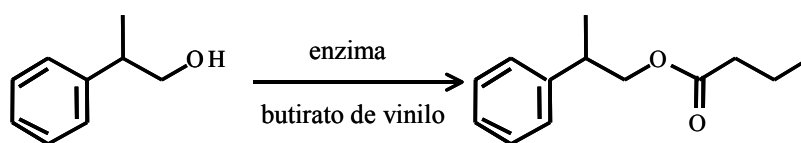
O (*R,S*)-2-fenil-1-propanol (com 97 % de pureza), o (*R*)- e o (*S*)-2-fenil-1-propanol (com 98 % de pureza), e o zeólito NaY, em pó, foram adquiridos à Aldrich, o butirato de vinilo (com 99 % de pureza) era da Fluka, o tridecano e o cloreto de sódio eram da Merck, o acetato de potássio e os reagentes de Karl–Fischer Hydranal Coulomat A e C eram da Riedel de Hæan. O butirato de (*R,S*)-2-fenil-1-propilo foi preparado como se descreve em Vidinha et al. [2004]. Os substratos e o tridecano foram armazenados na presença de peneiros moleculares (com orifícios de 3 Å, da Merck). Os LIs [C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>], [C<sub>8</sub>mim][PF<sub>6</sub>] e [C<sub>4</sub>mim][BF<sub>4</sub>] foram preparados segundo os procedimentos descritos por Park e Kazlauskas [2001], Huddleston et al. [2001] e Dupont et al. [2002], confirmou-se que estavam em condições de pH neutro antes da utilização. O etano, o CO<sub>2</sub> e o azoto foram fornecidos pela Air Liquide e tinham uma pureza indicada superior a 99.95 mol % (etano) e 99.995 mol %.

### 4.3.2 Imobilização da cutinase

A cutinase foi imobilizada por deposição [Gonçalves et al., 1996, Serralha et al., 1998]. Dissolveu-se a enzima liofilizada numa solução de fosfato de sódio de concentração 50 mM (com uma concentração de enzima de 10 mg mL<sup>-1</sup>), a pH 8,5. Adicionou-se o suporte à solução (na proporção 25 mg de cutinase por g de suporte) e, depois de se misturar em vortex durante 1 min, secou-se a preparação sob vácuo durante pelo menos 24 h. O rendimento médio de imobilização foi de (72 ± 12) % para o zeólito NaY, conforme se determinou com um método de Lowry modificado [Lowry et al., 1951].

### 4.3.3 Ensaios enzimáticos em Batch

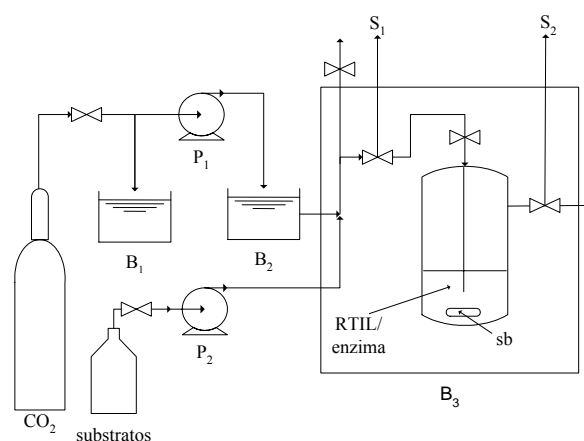
Para as reacções em fluidos supercríticos (FSC), utilizaram-se células de aço inox de volume variável (volume de reacção de aproximadamente 12 cm<sup>3</sup> na maioria das experiências), equipadas com uma janela de safira e com válvulas para enchimento da célula e para amostragem. Os detalhes da instalação de alta pressão e da técnica experimental foram referidos por Fontes et al. [2001 b]. As reacções realizadas em LIs e em *n*-hexano foram feitas em frascos de vidro (volume reaccional até 3,5 cm<sup>3</sup>), colocados num agitador orbital ajustado para 450 rpm, a temperatura constante. Em experiências realizadas com as duas enzimas em [C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>] e nas quais a agitação foi feita com uma barra de agitação magnética a velocidade elevada, obtiveram-se os mesmos resultados que os obtidos no agitador orbital, o que indica a ausência de limitações difusionais externas. Com excepção dos fluidos-sc, todos os componentes das misturas reaccionais foram pré-equilibrados através da fase de vapor ao valor de  $a_w$  seleccionado para cada experiência, com soluções saturadas de sais a 25 °C durante cerca de 3 dias, para atingir os valores  $a_w = 0,22$  (acetato de potássio) e  $a_w = 0,75$  (cloreto de sódio), retirados da literatura [Greenspan, 1977]. Para se atingir  $a_w = 0,7$  em CO<sub>2</sub>-sc, adicionou-se água directamente ao reactor antes da pressurização. Para se atingir  $a_w = 0,7$  em etano-sc, adicionou-se a etano-sc a quantidade de água necessária para o efeito, numa outra célula montada antes do reactor contendo a enzima, a fim de evitar efeitos de histerese na hidratação da mesma [Fontes et al., 2001 a] e/ou agregação. A reacção estudada (Esquema 1) foi a transesterificação do butirato de vinilo (170 mM) pelo (*R,S*)-2-fenil-1-propanol (60 mM). A reacção foi iniciada com a adição do álcool. Utilizou-se o tridecano (15 mM) como padrão externo para análise por cromatografia gasosa (GC). A concentração da água foi medida por titulometria de Karl-Fischer. Nos fluidos-sc, os valores de  $a_w$  foram calculados dividindo a concentração da água na mistura reaccional pela concentração da água na mesma mistura na saturação [Fontes et al., 2002].



**Esquema 1**

#### 4.3.4 Reacções em reactor contínuo

Fez-se passar uma corrente de CO<sub>2</sub>-sc com os substratos dissolvidos (caudal = 1 mL min<sup>-1</sup>, T = 35 °C, P = 100 bar, a<sub>w</sub> = 0,12, [2-fenil-1-propanol] = 60 mM, [butirato de vinilo] = 170 mM) através de [C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>] (5 mL) com a enzima suspensa (6 g L<sup>-1</sup> para a cutinase imobilizada, 4 g L<sup>-1</sup> para a Novozym), colocado no fundo de um reactor cilíndrico de alta pressão montado verticalmente (Fig. 4.1). A amostragem da corrente de CO<sub>2</sub> à entrada e à saída do reactor permitiu o cálculo da conversão da reacção, bem como a monitorização de a<sub>w</sub>.



**Fig. 4.1** Montagem utilizada nos ensaios efectuados em contínuo. P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> = bombas de HPLC. B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> = banhos termostáticos. S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> = amostragem. sb = barra de agitação.

#### 4.3.5 Métodos de análise

Quer a conversão, quer o excesso enantiomérico do substrato álcool não reagido (e.e.<sub>s</sub>) foram medidos por GC, num cromatógrafo gasoso da série Trace 2000 da Unicam. Condições de análise: coluna capilar não comercial de sílica fundida com 30 m × 0,32 mm (diâmetro interno), revestida com um filme de 0,25 μm de espessura de heptakis-(2,3-di-*O*-metil-6-*O*-*tert*-butildimetilsilil)-β-ciclodextrina (15 %) em SE 52 (DiMe); programa de forno: 90 °C durante 5 min, rampa 90-136 °C a 0,8 °C min<sup>-1</sup>, 200 °C durante 5 min; temperatura de injeção, 250 °C; temperatura do detector de ionização de chama (FID), 250 °C; gás de arraste, hélio (2,0 cm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup>); razão de split, 20:1. Não se detectaram produtos nos ensaios efectuados sem a presença de enzima. A razão enantiomérica, E, foi

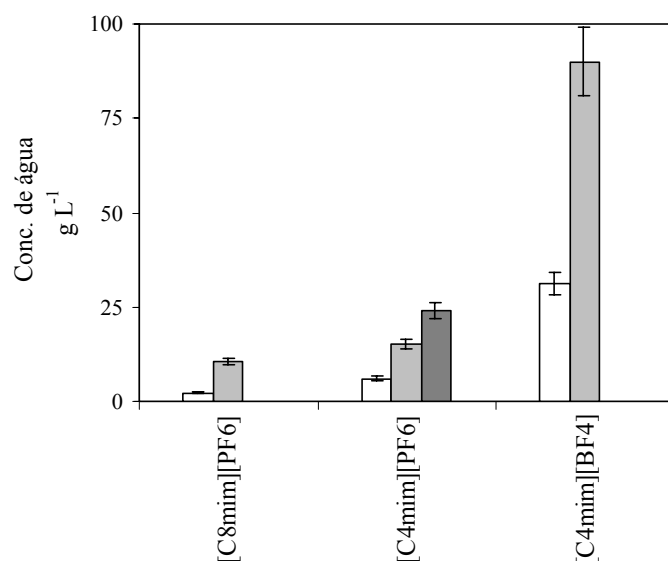


calculada através da expressão  $E = \{\ln[(1-c)(1-e.e.s)]\} / \{\ln[(1-c)(1+e.e.s)]\}$ , em que  $c$  é a conversão e  $e.e.s$  é relativo ao enantiómero ( $R$ ), a partir de dados obtidos para o substrato racémico no decurso da reacção (sempre que possível, para conversões até 0,5). Os resultados fornecidos são a média de pelo menos duas medições.

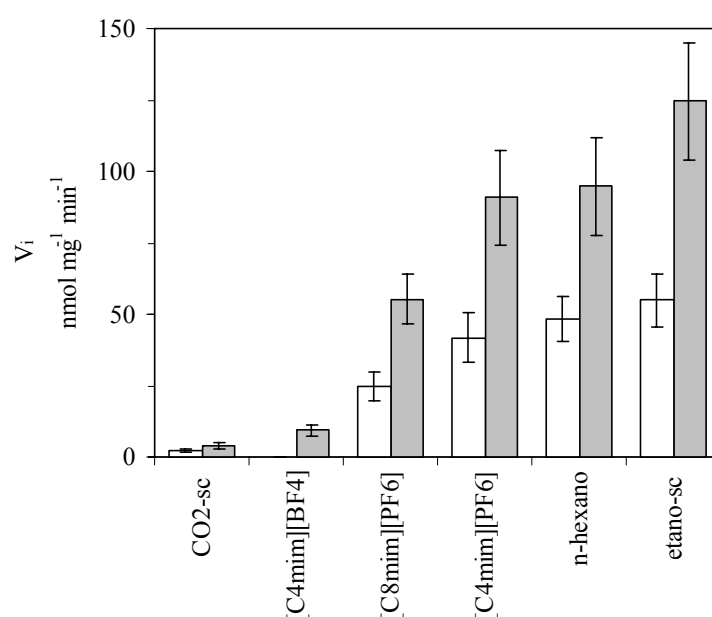
#### 4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A actividade da água ( $a_w$ ) é o parâmetro mais conveniente para correlacionar a actividade enzimática em meios não-aquosos [Halling, 1994]. Determinou-se a correspondência entre a concentração da água e  $a_w$  nos vários LIs testados mediante o equilíbrio dos mesmos através da fase de vapor com soluções saturadas de sais (Fig. 4.2). O  $[C_4mim][BF_4]$  é miscível com a água e, como tal, são necessárias maiores quantidades de água para atingir os valores de  $a_w$  pretendidos. Os dados obtidos com o  $[C_8mim][PF_6]$  e o  $[C_4mim][PF_6]$  estão em bom acordo com os que foram apresentados por Anthony et. al. [2001]. Berberich et al. [2003] também apresentam dados de solubilidade da água no  $[C_4mim][PF_6]$ . Estes autores compararam os resultados que obtiveram utilizando soluções saturadas de sais com os que obtiveram utilizando pares de sais hidratados *in situ*. Referem que houve boa concordância entre os dois conjuntos de resultados, que também estavam em bom acordo com os publicados por Anthony et al. [2001].

O aumento de  $a_w$  de 0,2 para 0,7 teve um impacto positivo nas velocidades de transesterificação da cutinase imobilizada no zeólito NaY em todos os solventes (Fig. 4.3). A enzima exibiu uma actividade de transesterificação mais elevada em etano-sc, *n*-hexano e  $[C_4mim][PF_6]$ , que foi mais de uma ordem de grandeza inferior em  $CO_2$ -sc. Os coeficientes de actividade calculados para os substratos [Garcia et al., 2004] mostraram que quer o álcool, quer o éster, estão mais bem solvatados em *n*-hexano do que em  $CO_2$ -sc, e portanto estão menos disponíveis para a reacção em *n*-hexano. Assim, a baixa actividade que a cutinase exhibe em  $CO_2$ -sc não resulta de uma menor tendência para os substratos acederem ao centro activo da enzima, mas sim de um efeito negativo directo do  $CO_2$ -sc sobre a enzima. Só uma análise termodinâmica semelhante para os LIs testados poderia elucidar em que medida as diferenças observadas na Fig. 4.3 se devem a diferenças de solvatação dos substratos.



**Fig. 4.2** Concentração da água em LI a  $a_w = 0,2$  (barras brancas),  $a_w = 0,7$  (barras cinzento claro), e na saturação (barra cinzento escuro), a  $T = 25\text{ }^\circ\text{C}.$

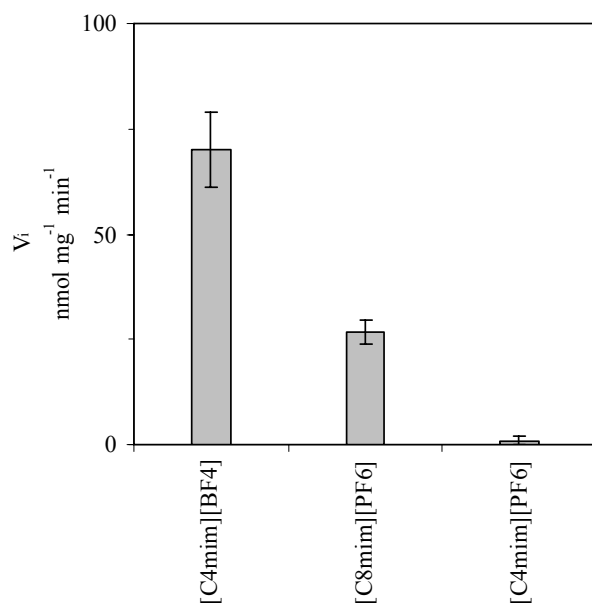


**Fig. 4.3** Velocidades iniciais de transesterificação para a cutinase imobilizada no zeólito NaY em LIs, fluidos-sc e *n*-hexano, a  $a_w = 0,2$  e  $a_w = 0,7$ . O código para as barras é o mesmo da Fig. 4.2  $T = 35\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $P = 100\text{ bar}$  (fluidos-sc). [2-fenil-1-propanol] = 60 mM. [butirado de vinilo] = 170 mM. [cutinase imobilizada] = 6 g L<sup>-1</sup> (LIs), 1 g L<sup>-1</sup> (etano-sc e *n*-

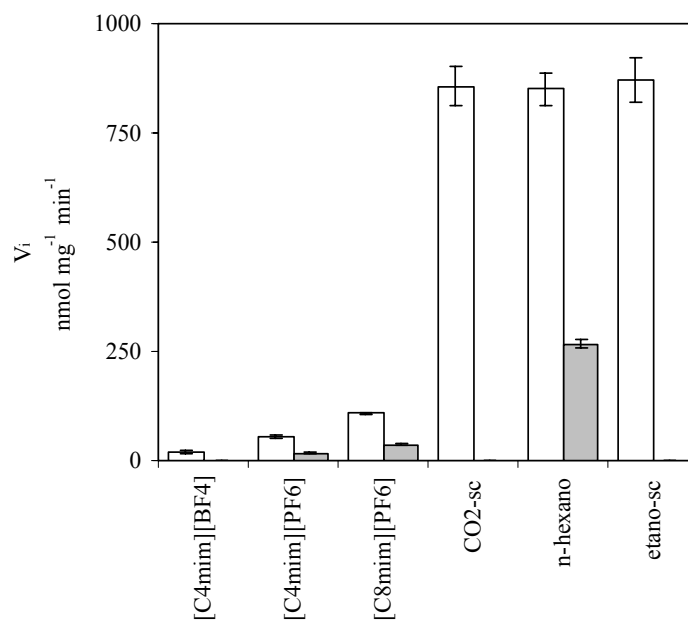
hexano), 4 g L<sup>-1</sup> (CO<sub>2</sub>-sc). As velocidades são dadas por mg de preparação de enzima imobilizada.

É no entanto de referir que as velocidades de transesterificação não dão uma verdadeira medida da actividade da cutinase. O mecanismo catalítico das duas enzimas utilizadas no presente estudo envolve a ligação do éster num primeiro passo e prossegue com a ligação do nucleófilo. Consoante a quantidade de água disponível no meio, pode ocorrer inibição competitiva entre a água e o álcool. Não se detectou hidrólise em etano-sc, *n*-hexano ou em CO<sub>2</sub>-sc aos dois valores de *a<sub>w</sub>* testados; em LIs, observou-se hidrólise apenas a *a<sub>w</sub>* = 0,7 (Fig. 4.4). Dado que a solubilidade da água é maior em [C<sub>4</sub>mim][BF<sub>4</sub>], a um dado valor de *a<sub>w</sub>* haverá um maior número de moléculas de água disponíveis para a enzima neste LI do que nos outros dois. De facto, as velocidades de hidrólise foram mais elevadas em [C<sub>4</sub>mim][BF<sub>4</sub>]. No entanto, a solubilidade de água em [C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>] é superior à solubilidade da água em [C<sub>8</sub>mim][PF<sub>6</sub>], e apesar disso a hidrólise foi mais pronunciada neste último solvente. Entrando em linha de conta com a hidrólise, pode-se verificar que, apesar de as velocidades de transesterificação terem sido claramente mais elevadas para a cutinase imobilizada no zeólito NaY em [C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>] a *a<sub>w</sub>* = 0,7 do que nos outros dois LIs, as velocidades iniciais totais (transesterificação + hidrólise) foram muito semelhantes nos três LIs. Observou-se uma maior discriminação dos solventes a *a<sub>w</sub>* baixa. Como se vê na Fig. 4.3, a *a<sub>w</sub>* = 0,2 não se detectou o produto éster em [C<sub>4</sub>mim][BF<sub>4</sub>], e a velocidade inicial de transesterificação em [C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>] foi quase o dobro da registada em [C<sub>8</sub>mim][PF<sub>6</sub>].

Ao contrário do que se verificou com a cutinase, a actividade de transesterificação da Novozym diminuiu com o aumento de *a<sub>w</sub>* (Fig. 4.5) Existem na literatura resultados semelhantes para esta enzima em diferentes reacções de transesterificação [Berberich et al., 2003, Lozano et al., 2002] e de esterificação [Peres et al., 2005, Chamouleau et al., 2001].



**Fig. 4.4.** Velocidades iniciais de hidrólise para a cutinase imobilizada no zeólito NaY em LIs a  $a_w = 0,7$ . As condições reaccionais são as mesmas da Fig. 4.3.

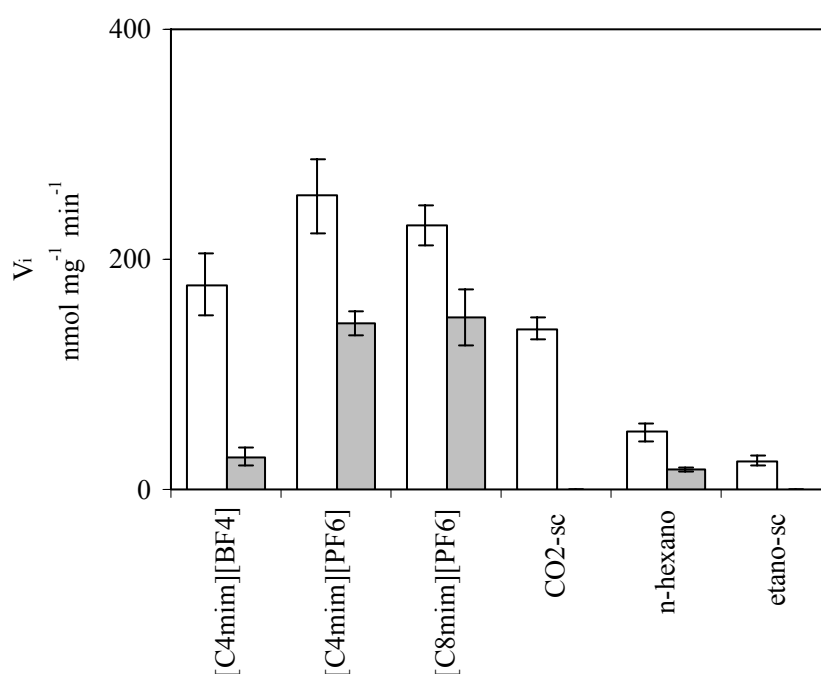


**Fig. 4.5** Velocidades iniciais de transesterificação para a Novozym em LI, fluidos-sc e *n*-hexano, a  $a_w = 0,2$  e  $a_w = 0,7$  (não se recolheram dados a  $a_w = 0,7$  em fluidos-sc).

[Novozym] = 2 g L<sup>-1</sup> ou 4 g L<sup>-1</sup> (LI). As restantes condições reaccionais são as indicadas na Fig. 4.3. As velocidades são dadas por mg de Novozym.

Observou-se hidrólise em todos os solventes (Fig. 4.6). A extensão da hidrólise a  $a_w = 0,2$  foi muito superior à observada com a cutinase a  $a_w = 0,7$ , o que mostra que a Novozym é menos selectiva para a transesterificação do que a cutinase. Curiosamente, o impacto negativo do aumento de  $a_w$  na actividade da Novozym conduziu a uma diminuição das velocidades de hidrólise tanto ao valor de  $a_w$  mais elevado, como ao valor de  $a_w$  mais baixo. Um aspecto que chama logo a atenção na Fig. 4.5 relativamente à Fig. 4.3 é a semelhança da actividade de transesterificação desta enzima em etano-sc ou *n*-hexano e em CO<sub>2</sub>-sc. Este facto deverá estar relacionado com a própria enzima, e também com o tipo de imobilização. A imobilização em zeólitos não confere à cutinase protecção contra o CO<sub>2</sub>, ao contrário de outros tipos de imobilização [Vidinha et al., 2005]. Os zeólitos têm uma estrutura microporosa, estando a cutinase apenas adsorvida à superfície externa do suporte [Gonçalves et. al., 1996, Serralha et al. 1998]. A Novozym, por outro lado, tem uma estrutura macroporosa na qual a enzima está oclusa. Peres et. al. [2003] e Almeida et al. [1998] também referem um efeito negativo do CO<sub>2</sub>-sc menos pronunciado na Novozym do que noutras proteases. Outra diferença apreciável entre a Fig. 4.3 e a Fig. 4.5 são as baixas velocidades de reacção obtidas para a Novozym em LIs, quando comparadas com as obtidas para a cutinase. Apesar de Schöfer et al. [2001] terem apresentado conversões muito baixas para esta enzima em [C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>] e [C<sub>4</sub>mim][BF<sub>4</sub>], Park e Kazlauskas [2001], Lau et al. [2000] e Sheldon et al. [2002] obtiveram velocidades de reacção naqueles LIs semelhantes às velocidades medidas nos solventes orgânicos vulgarmente utilizados. Uma vez que a disponibilidade dos substratos é a mesma num dado solvente e que as velocidades de reacção para a cutinase nos dois LIs testados foram semelhantes às medidas em etano-sc e em *n*-hexano, as baixas velocidades de reacção para a Novozym em LIs não podem ser justificadas com base em argumentos assentes na solvatação dos substratos. Os resultados obtidos no presente estudo em LIs podem muito provavelmente reflectir a existência de limitações difusionais internas resultantes da elevada viscosidade dos solventes [Branco et al., 2002, Huddleston et al., 2001] e, como tal, uma dificuldade acrescida para os substratos penetrarem nos poros da Novozym. Esta dificuldade pode ter sido ultrapassada pela selecção das concentrações dos substratos utilizadas por Berberich

et al. [2003] que reportam velocidades de transesterificação semelhantes para esta enzima em *n*-hexano e em  $[C_4mim][PF_6]$ , na gama de valores de  $a_w$  do presente estudo. É de referir que, no presente estudo, a Novozym exibiu uma actividade mais elevada em  $[C_8mim][PF_6]$  do que em  $[C_4mim][PF_6]$ , ao contrário da cutinase. O  $[C_8mim][PF_6]$  é o mais viscoso dos três LIs utilizados (a sua viscosidade é quase o dobro da do  $[C_4mim][PF_6]$ ) [Branco et al., 2002, Huddleston et al., 2001]. Assim, o perfil de velocidade observado para a Novozym em LIs deve reflectir a influência de outro factor para além das limitações difusionais.



**Fig. 4.6** Velocidades iniciais de hidrólise para a Novozym em LIs, fluidos-sc e *n*-hexano a  $a_w = 0,2$  e  $a_w = 0,7$  (não se recolheram dados a  $a_w = 0,7$  em fluidos-sc). Condições reaccionais iguais às da Fig. 4.5.

Como se referiu atrás, a combinação de LIs com fluidos-sc tem sido aplicada com sucesso [Laszlo, 2001, Lozano et al., 2002, Reetz et al., 2002, Lozano et al., 2003, Reetz et al., 2003]. No presente estudo, utilizou-se um processo em contínuo em que a enzima se encontrava suspensa em  $[C_4mim][PF_6]$  e o  $CO_2$ -sc actuava como veículo de transporte dos substratos e produtos para/da enzima. A conversão da reacção aumentou no início mas

assumiu rapidamente um valor constante. Os resultados obtidos foram notáveis. No caso da cutinase, a velocidade de transesterificação medida foi de  $(130 \pm 15) \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ . A presença do LI evitou o efeito negativo pronunciado que o contacto directo da cutinase com o  $\text{CO}_2$ -sc tem nesta enzima (Fig. 4.3). Este facto sugere que o microambiente da enzima é maioritariamente determinado pelo LI, mesmo para as concentrações elevadas de  $\text{CO}_2$  dissolvido que é possível atingir em  $[\text{C}_4\text{mim}][\text{PF}_6]$  [Anthony et al., 2002]. Uma das vantagens apontadas para este tipo de sistema é exactamente um efeito protector do LI contra o  $\text{CO}_2$  [Lozano et al., 2002, Lozano et al., 2003]. O valor de velocidade de reacção referido acima, medido a um valor de  $a_w$  menos favorável ( $a_w = 0,12$ ) do que o utilizado nas experiências em descontínuo, sugere que algo mais deverá ter contribuído para o melhor funcionamento da cutinase nas experiências com o reactor contínuo. Este efeito adicional pode ter por base o impacto, na solvatação dos substratos, da concentração elevada de  $\text{CO}_2$  dissolvido no LI, por via de coeficientes de actividade mais elevados do que no caso do LI sozinho, e consequentemente uma maior disponibilidade dos substratos para a reacção. Também se testou a estabilidade do sistema reaccional. Realizou-se um ensaio durante cerca de quatro horas, lavou-se depois o sistema com  $\text{CO}_2$ -sc e manteve-se a pressão de  $\text{CO}_2$  durante dois dias antes de recomeçar a adição dos substratos; repetiu-se o processo logo a seguir, ou seja, no total, a enzima foi mantida dentro do LI sob pressão de  $\text{CO}_2$  durante seis dias e catalisou três reacções. As três velocidades de transesterificação obtidas estavam em bom acordo. Já tinha sido referido que a cutinase era muito estável em  $\text{CO}_2$ -sc [Sereti et al., 1997]. A velocidade de transesterificação medida para a Novozym no reactor contínuo foi de  $(412 \pm 45) \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ . Neste caso, o valor de  $a_w$  ao qual as experiências em contínuo foram realizadas deverá ter sido benéfico para a actividade da enzima [Berberich et al., 2003], apesar de tal não ser suficiente para explicar o aumento acentuado da velocidade da reacção relativamente ao LI sozinho (Fig. 4.5). Mais uma vez, este resultado deverá reflectir a influência do  $\text{CO}_2$  dissolvido no LI que provoca uma diminuição da viscosidade deste último, facilitando assim a transferência de massa e aliviando as limitações difusionais.

A enantioselectividade das duas enzimas relativamente ao 2-fenil-1-propanol foi baixa (valores de E entre 1,5 e 2,5, para a cutinase, e entre 2 e 3, para a Novozym) em todas as

condições reaccionais testadas. Vidinha et al. [2004] apresentam uma racionalização dos baixos valores de E obtidos para a cutinase, baseada em estudos de modelação molecular.

## **4.5 CONCLUSÃO**

A actividade das enzimas em meios não aquosos pode depender muito de factores como a actividade da água, a solvatação dos substratos, as condições de imobilização e interacções directas solvente-enzima, tal como se demonstrou no presente estudo. Ao testar-se enzimas em condições comparáveis em LIs, fluidos-sc e solventes orgânicos, consegue-se ter uma perspectiva mais global dos parâmetros importantes nas diferentes classes de meios não convencionais, ter uma base mais sólida para otimizar o comportamento das enzimas nesses meios, e fazer uma melhor análise das opções disponíveis. Tal como foi demonstrado por Laszlo [2001], Lozano et al. [2002], Reetz et al. [2002], Lozano et al. [2003], Reetz et al. [2003] e também no presente estudo, os sistemas LI/CO<sub>2</sub>-sc têm um grande potencial na biocatálise. As vantagens incluem a protecção proporcionada pelo LI contra um possível efeito negativo do CO<sub>2</sub> sobre a enzima, e o alívio dos problemas de transferência de massa que frequentemente se verificam com preparações de enzimas imobilizadas. Outro aspecto muito importante é o de os sistemas LI/CO<sub>2</sub>-sc permitirem a concepção de processos integrados de biocatálise/separação ambientalmente favoráveis.

## **AGRADECIMENTOS**

Este trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia através dos contratos PRAXIS/P/BIO/14314/1998 e POCTI/35429/QUI/2000 e pelas bolsas PRAXIS XXI/BD/21615/99 (S. Garcia) e ITQB/039/BIC/2001 (N. Lourenço), e pelo FEDER. Agradece-se o apoio do Ricardo Baptista na produção da cutinase. Agradece-se à Novo Nordisk Bioindustrial, Espanha, a oferta da Novozym.



## **CAPÍTULO 5**

### **Actividade e Enantioselectividade da Cutinase a Baixa Temperatura em Meios Não-Convencionais**



## 5 ACTIVIDADE E ENANTIOSELECTIVIDADE DA CUTINASE A BAIXA TEMPERATURA EM MEIOS NÃO-CONVENCIONAIS

### 5.1 RESUMO

Mediu-se a actividade catalítica da cutinase de *Fusarium solani pisi* imobilizada à superfície do zeólito NaY e da lipase B de *Candida antarctica* (CALB) imobilizada numa resina acrílica macroporosa (Novozym 435) na transesterificação do butirato de vinilo com o 2-fenil-1-propanol em *n*-hexano, a temperaturas entre  $-18$  e  $35$  °C e valores de actividade da água ( $a_w$ ) fixados à temperatura ( $T$ ) ambiente. A  $0$  e  $-18$  °C, a cutinase exibiu cerca de 50 e 20 % da actividade exibida a  $35$  °C, respectivamente, valores que desceram para cerca de 30 e 10 % no caso da CALB. O cálculo dos coeficientes de difusão a diluição infinita dos dois substratos no *n*-hexano sugeriu que aquelas variações de actividade não deverão reflectir quaisquer limitações difusionais externas. A diminuição de  $T$  não afectou substancialmente a razão das velocidades de transesterificação e de hidrólise para as duas enzimas. A enantioselectividade ( $E$ ) da cutinase foi medida em *n*-hexano, em acetonitrilo e no líquido iónico 1-*n*-butil-3-metilimidazólio hexafluorofosfato ( $[C_4mim][PF_6]$ ). O valor de  $E$  praticamente duplicou quando  $T$  desceu de  $35$  para  $0$  °C, mas manteve-se constante ( $E \approx 4,6$ ) com uma diminuição adicional de  $T$  até  $-25$  °C. O valor de  $E$  obtido em *n*-hexano para valores de  $T$  iguais ou inferiores a  $0$  °C foi idêntico ao obtido em  $[C_4mim][PF_6]$  a  $-18$  °C, apesar da provável existência de limitações difusionais externas devido à elevada viscosidade do LI. Ainda, a informação existente sobre o equilíbrio de fases nos sistemas binários formados por cada um daqueles solventes com a água sugere que terá havido separação de fases às temperaturas de trabalho mais baixas. Em acetonitrilo,  $E$  da cutinase não variou com  $T$ , e o mesmo se observou para a CALB. No entanto, em *n*-hexano  $E$  da CALB teve uma variação com a temperatura que conduziu a uma relação linear de  $\ln E$  com o inverso de  $T$ , como esperado ( $E$  aumentou cerca de 5 vezes entre  $35$  e  $-25$  °C).

## 5.2 INTRODUÇÃO

A selectividade das enzimas e, em particular, a enantioselectividade, é uma das características que tornam a biocatálise tão apelativa do ponto de vista de aplicações industriais [Krishna, 2002, Turner, 2003, Schoemaker, 2003, Chikusa et al., 2003, Ghanem e Abul-Enein, 2005]. Nestes casos, qualquer aumento da razão enantiomérica,  $E$ , pode ser muito importante.

A temperatura é um dos parâmetros experimentais que podem ter impacto em  $E$ , como foi verificado por Keinan et al. [1986] na redução de cetonas em meio aquoso catalisada por uma desidrogenase entre 7 e 50 °C e por Lam et al. [1986] na hidrólise de ésteres em meio aquoso catalisada por uma esterase entre -10 e 20 °C. Este facto foi racionalizado por Pham et al. [1989] e Pham e Phillips [1990] no decurso da resolução de álcoois simples secundários, catalisada por uma desidrogenase em meio aquoso, entre 15 e 65 °C. Estes autores introduziram o conceito de temperatura racémica ( $T_r$ ), a temperatura à qual, aplicando a teoria do estado de transição, não se espera que a enzima discrimine os enantiómeros. De facto, sendo a relação entre  $E$  e a diferença entre as energias de Gibbs de activação para os dois enantiómeros,  $\Delta\Delta G^\ddagger$ , dada por  $\Delta\Delta G^\ddagger = -RT \ln E = \Delta\Delta H^\ddagger - T \Delta\Delta S^\ddagger$ , em que  $\Delta\Delta H^\ddagger$  e  $\Delta\Delta S^\ddagger$  são a diferença entre as entalpias e entropias de activação, respectivamente, para os dois enantiómeros, tem-se, para  $\Delta\Delta G^\ddagger = 0$ ,  $E = 1$ , vindo  $T_r = \Delta\Delta H^\ddagger / \Delta\Delta S^\ddagger$ . Esta análise prevê que se verifique a inversão da preferência da enzima relativamente aos enantiómeros com a variação da temperatura. Para o caso do 2-butanol, os autores comprovaram experimentalmente a existência de uma temperatura abaixo da qual a enzima deixava de preferir o enantiómero  $-(R)$  para passar a preferir o enantiómero  $-(S)$ . Estes resultados levaram os autores a sugerir que a temperatura poderia ser uma variável crítica em reacções assimétricas catalisadas por enzimas.

Também Holmberg e Hult [1991], com base nos resultados obtidos com a lipase de *Candida rugosa* em reacções de hidrólise em meio aquoso e de transesterificação em ciclohexano entre 6 e 37 °C, propuseram que a temperatura fosse considerada como mais um instrumento para o aumento de  $E$ , nos casos em que a diminuição de velocidade da reacção associada a essa diminuição de temperatura fosse aceitável. Este tema foi revisto

por Phillips [1996] que, com base nos aumentos de 4 a 5 vezes verificados até então nos valores de  $E$ , como resultado de variações de temperatura, sugeriu que manipulações deste parâmetro seriam uma forma prática de fazer um ajuste fino da estereoquímica de reacções catalisadas por enzimas, embora não em detrimento da manipulação de outros parâmetros experimentais. Tal como o autor refere, para  $T < T_r$ , a contribuição dominante será o termo  $\Delta\Delta H^\#$ , e  $E$  deverá diminuir com o aumento de  $T$ , até atingir o valor 1 a  $T = T_r$ . Para  $T > T_r$ , o termo  $T\Delta\Delta S^\#$  será a contribuição dominante para  $\Delta\Delta G^\#$ , e  $E$  deverá aumentar com o aumento de  $T$  (a temperatura racémica foi mais recentemente denominada de temperatura de inversão,  $T_{inv}$  [Cainelli et al., 2000]). O termo  $\Delta\Delta H^\#$  resulta das diferenças entre os modos como os dois enantiómeros se ajustam ao local de ligação à enzima, do ponto de vista da estereoquímica, e o termo  $\Delta\Delta S^\#$  reflecte a influência de interacções hidrofóbicas dos enantiómeros com o solvente, bem como perdas de mobilidade rotacional e translacional dos enantiómeros no estado de transição.

O impacto do abaixamento da temperatura nos valores de  $E$  obtidos em biotransformações tem continuado a ser explorado desde então. Contudo, a aplicabilidade desta abordagem aumentou bastante com o advento da biocatálise em meios não aquosos [Zaks e Klivanov, 1984]. Nestes meios, como se tem verificado nos últimos vinte anos, as enzimas são normalmente mais estáveis do que em meio aquoso, conseguem catalisar reacções que são termodinamicamente desfavoráveis em água e podem exhibir uma selectividade diferente da observada em meio aquoso [Klivanov, 2001, Krishna, 2002]. Nos casos em que os valores de  $E$  são baixos à temperatura ambiente, a utilização de meios não aquosos possibilita a realização de reacções enzimáticas a temperaturas suficientemente baixas para que o aumento de  $E$  associado atinja valores de utilidade prática [Ljubovic et al., 1999]. Este facto foi explorado pela primeira vez por Sakai et al. [1997] que, após uma selecção de lipases, solventes e agentes acilantes, utilizaram o abaixamento da temperatura de 30 para  $-40^\circ\text{C}$  para aumentarem de 17 para 99 o valor de  $E$  na resolução de um álcool catalisada pela lipase de *Burkholderia cepacia* (lipase PS). Para que as conversões de interesse fossem atingidas em tempo útil, aqueles autores acompanharam a diminuição da temperatura com um aumento da quantidade de enzima utilizada. Desde então, vários exemplos do denominado “método da baixa temperatura” [Sakai et al., 2003 b] se seguiram [e. g. Miyazawa et al., 1997, Wegman et al., 1999, Ljubovic et al., 1999, Aoyagu

et al., 2003], conforme revisto por Sakai [2004]. Em particular, Sakai e colaboradores implementaram metodologias de imobilização com vista a reduzir o impacto negativo da temperatura nas velocidades de reacção [Sakai et al., 2003 a, 2003 b, 2005].

No presente trabalho aborda-se o impacto do abaixamento da temperatura na actividade da cutinase imobilizada à superfície do zeólito NaY em *n*-hexano, bem como na enantioselectividade da enzima naquele solvente, em acetonitrilo e no líquido iónico (LI) 1-*n*-butil-3-metilimidazólio hexafluorofosfato ([C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>]). Os LIs emergiram recentemente como solventes alternativos aos meios orgânicos em biotecnologia [Erbeldinger et al., 2000, Cull et al., 2000], e têm sido cada vez mais utilizados desde então, conforme revisto por Rantwijk et al. [2003] e Sheldon [2005]. Uma das principais vantagens dos LIs é a pressão de vapor desprezável que possuem. Esta e outras características colocam os LIs na classe de solventes ambientalmente sustentáveis [DeSimone, 2002], embora estejam em curso estudos focados na avaliação de riscos potenciais dos LIs no ciclo completo de vida dos mesmos [Jastorff et al., 2003, Jastorff et al., 2005]. No presente estudo, utilizou-se também a lipase B de *Candida antarctica* (CALB) imobilizada numa resina acrílica macroporosa (Novozym 435), para comparação.

## 5.3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.3.1 Materiais

A cutinase de *Fusarium solani pisi* foi produzida a partir de uma estirpe WK-6 de *Escherichia coli* (oferecida pela Corvas International, Ghent, Bélgica) e purificada no Centro de Engenharia Biológica e Química, Instituto Superior Técnico [Carvalho et al., 1999, Lauwereys et al., 1990]. A pureza da enzima foi controlada por electroforese e focagem isoelectrica. A actividade estereolítica da enzima (30 nM) foi determinada espectrofotometricamente a 400 nm através da hidrólise do butirato *p*-nitrofenílico (0,56 mM) em tampão fosfato de potássio de concentração 50 mM, a pH = 8,5. A lipase B de *Candida antarctica* (CALB) imobilizada numa resina acrílica macroporosa (Novozym 435) foi gentilmente cedida pela Novo Nordisk Bioindustrial, Espanha.

O (*R,S*)-2-fenil-1-propanol (com 97 % de pureza), o (*R*)- e o (*S*)-2-fenil-1-propanol (com 98 % de pureza), o zeólito NaY, em pó, o tridecano e o cloreto de sódio foram adquiridos à Sigma-Aldrich, o butirato de vinilo (com 99 % de pureza) era da Fluka, o *n*-hexano e o acetonitrilo eram da Merck, os reagentes de Karl–Fischer Hydranal Coulomat A e C eram da Riedel de Hæan. Os butiratos de (*R*)- e de (*S*)-2-fenil-1-propilo foram preparados como se descreve em Vidinha et al. [2004]. Os solventes orgânicos, os substratos e o tridecano foram armazenados na presença de peneiros moleculares (com orifícios de 3 Å, da Merck). O LI [C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>] era da Solchemar.

### 5.3.2 Imobilização da cutinase no zeólito NaY

A cutinase foi imobilizada por deposição [Gonçalves et al., 1996, Serralha et al., 1998]. Dissolveu-se a enzima liofilizada numa solução de fosfato de sódio de concentração 50 mM (com uma concentração de enzima de 10 mg mL<sup>-1</sup>), a pH 8,5. Adicionou-se o suporte à solução (na proporção 25 mg de cutinase por g de suporte) e, depois de se misturar em vortex durante 1 min, secou-se a preparação sob vácuo durante pelo menos 24 h. O rendimento médio de imobilização foi de (72 ± 12) %, conforme se determinou com um método de Lowry modificado [Lowry et al., 1951].

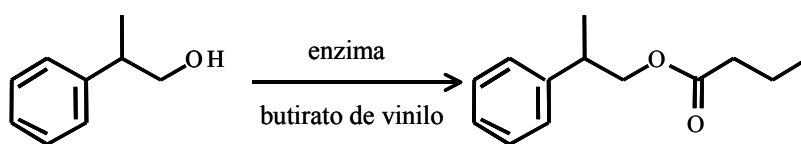
### 5.3.3 Ensaios enzimáticos

A reacção estudada (Esquema 1) foi a transesterificação do butirato de vinilo (300 mM) pelo (*R,S*)-2-fenil-1-propanol (100 mM). As concentrações de cutinase imobilizada em zeólito e de Novozym variaram entre 1 e 12 e 1 e 5 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente, em *n*-hexano. As reacções foram feitas em frascos fechados de vidro (volume reaccional de 4 mL, excepto no caso do LI em que aquele volume foi de 1 mL). O *n*-hexano e os substratos foram pré-equilibrados através da fase de vapor com uma solução saturada de cloreto de sódio a 25 °C durante cerca de 3 dias, para atingir o valor  $a_w = 0,75$ , retirado da literatura [Greenspan, 1977]. Em acetonitrilo e no LI,  $a_w$  foi fixado por adição directa de água, de acordo com os dados fornecidos por Bell et al. [1997] e Garcia et al. [2004], respectivamente. A mistura reaccional, sem o substrato álcool, foi equilibrada durante 1 h à temperatura do banho de termostatização (mistura 1:1 de água e etilenoglicol, para temperaturas negativas), após o que se adicionou o álcool para dar início à reacção. As misturas reaccionais foram agitadas com uma barra de agitação magnética, excepto no caso

do LI, em que não houve agitação. A concentração da água foi medida em todos os solventes por titulometria de Karl-Fischer.

### 5.3.4 Métodos de análise

Quer a conversão, quer o excesso enantiomérico do substrato álcool não reagido (e.e.<sub>s</sub>) e do éster produto (e.e.<sub>p</sub>) foram medidos por GC, num cromatógrafo gasoso da série Trace 2000 da Unicam, utilizando o tridecano como padrão externo. Condições de análise: coluna capilar, da BGB Analytik, com 30 m × 0,25 mm (diâmetro interno), revestida com um filme de 0,25 µm de espessura de 2,3-dimetil-6-*ter*-butildimetilsilil-β-ciclodextrina (20 %) dissolvido em SE-52 (5 % fenil-, 95 % metilpolisiloxano); programa de forno: rampa 115-137 °C a 1 °C min<sup>-1</sup>; temperatura de injeção, 250 °C; temperatura do detector de ionização de chama (FID), 250 °C; gás de arraste, hélio (4,8 mL min<sup>-1</sup>); razão de split, 20:1. Tempos de retenção: 3,10 min (ácido butírico), 10,19 min (tridecano), 11,29 min ((*R*)-2-fenil-1-propanol), 11,70 min ((*S*)-2-fenil-1-propanol), 20,61 min (butirato de (*R*)-2-fenil-1-propilo), 20,77 min (butirato de (*S*)-2-fenil-1-propilo). Não se detectaram produtos nos ensaios efectuados sem a presença de enzima. A razão enantiomérica, *E*, foi calculada através das expressões  $E = \frac{\{\ln[(1-c)(1-e.e._s)]\}}{\{\ln[(1-c)(1+e.e._s)]\}}$  e  $E = \frac{\{\ln[1-c(1+e.e._p)]\}}{\{\ln[1-c(1-e.e._p)]\}}$  [Straathof e Jongejan, 1997], em que *c* é a conversão e e.e.<sub>s</sub> e e.e.<sub>p</sub> são relativos ao enantiómero (*R*), a partir de dados obtidos para o substrato racémico no decurso da reacção (dados recolhidos para conversões até 0,5). Todos os resultados fornecidos são a média de, pelo menos, duas medições.

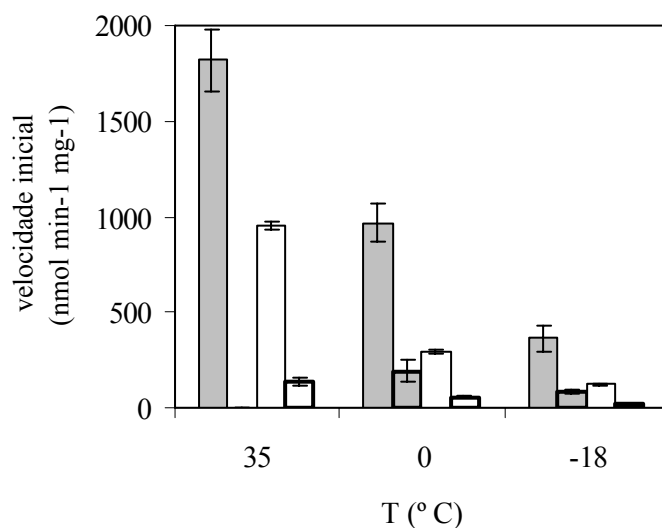


**Esquema 1**



## 5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O efeito da temperatura na actividade de transesterificação em *n*-hexano foi semelhante para a cutinase imobilizada no zeólito NaA e para a Novozym, embora o impacto da diminuição da temperatura tenha sido mais acentuado para a Novozym. Na realidade, a 0 °C, a cutinase exibiu cerca de 50 % da actividade manifestada a 35 °C, valor que desceu para perto dos 20 % a -18 °C. No caso da Novozym, aquelas duas percentagens baixaram para cerca de 30 e 10 %, respectivamente. Este facto poderá estar relacionado com a mobilidade conformacional das enzimas. No estudo de Zaks e Klivanov [1984] sobre a eficiência catalítica de uma lipase a 100 °C em meios não aquosos contendo muito pouca água, que marca o advento da biocatálise neste tipo de meios, aqueles autores correlacionaram a estabilidade acrescida da enzima e a selectividade da mesma para o substrato com uma mobilidade conformacional mais reduzida da enzima desidratada. Por outro lado, estudos realizados com enzimas produzidas por microorganismos psicrófilos e termófilos, naturalmente adaptados a habitats frios e quentes, respectivamente [Georlette, 2003, Hoyoux, 2004], permitiram de igual modo correlacionar a actividade aumentada a baixa temperatura, exibida pelas enzimas produzidas por pricrófilos, com uma desestabilização estrutural das moléculas de enzima, especialmente na zona do centro activo, e com uma flexibilidade conformacional elevada. É, no entanto, de referir que ambas as enzimas estão imobilizadas e que as interacções com o suporte serão também importantes neste contexto.



**Fig. 5.1** Efeito da temperatura nas velocidades iniciais de transesterificação (barras com rebordo fino) e de hidrólise (barras com rebordo grosso) para a cutinase imobilizada no zeólito NaY (barras cinzentas) e para a Novozym (barras brancas), em n-hexano. Não se detectou hidrólise com a cutinase a 35 °C. Todos os componentes da mistura reaccional foram pré-equilibrados a  $a_w = 0,7$ , à temperatura ambiente. [2-fenil-1-propanol] = 100 mM. [butirado de vinilo] = 300 mM. As velocidades iniciais são dadas por mg de proteína (cutinase) ou por mg de preparação enzimática (Novozym).

Tal como se indica na legenda da figura 5.1, os constituintes da mistura reaccional foram pré-equilibrados a um valor de actividade da água ( $a_w$ ) de 0,7, à temperatura ambiente ( $a_w$  é o parâmetro mais conveniente para correlacionar a actividade enzimática em meios não aquosos [Halling, 1994]). A selecção deste valor de  $a_w$  deveu-se ao facto de a actividade da cutinase imobilizada em zeólitos ser mais elevada a  $a_w = 0,7$  do que a  $a_w = 0,2$ , por exemplo [Garcia et al., 2005], e a cutinase ser o foco principal do presente trabalho. No entanto, com a Novozym acontece o inverso [Garcia et al., 2004]. Na realidade, e como as reacções foram realizadas a um valor de  $a_w$  pré-ajustado mas não controlado *in-situ* com tampões apropriados, as misturas reaccionais deverão ter saturado durante as manipulações das mesmas que não decorreram em circuito fechado. Este aspecto poderá ter contribuído para o facto de a razão das velocidades de transesterificação e de hidrólise para as duas enzimas ter sido pouco afectada pela temperatura, como os dados da Figura 5.1 indicam.

Se as misturas reaccionais não tivessem saturado por aquela via, o abaixamento da temperatura teria conduzido ao mesmo resultado. O sistema binário (*n*-hexano + água) é caracterizado por uma reduzida miscibilidade mútua. Dados de equilíbrio líquido-líquido em função da temperatura para este sistema na gama 0 a 40 °C [Sorensen et al., 1979] indicam que, no domínio bifásico,  $a_W$  (que é igual em ambas as fases) tem aproximadamente o valor 1 (a fase aquosa é praticamente água pura, com uma fracção molar,  $x_W \approx 1$ , sendo o coeficiente de actividade na convenção simétrica,  $\gamma_W \approx 1$ ; vem portanto  $a_W = x_W \gamma_W \approx 1$ ). Assim, quando se estabelece no sistema (*n*-hexano + água) um valor de  $a_W$  a uma temperatura próxima da ambiente e se reduz depois a temperatura, mantendo a composição da mistura constante,  $a_W$  aumenta, atingindo o valor 1 na região bifásica. Para temperaturas inferiores a 0 °C, e na gama de composições considerada, poder-se-á esperar o aparecimento de uma fase sólida de água em equilíbrio com uma fase líquida rica em *n*-hexano. É importante mencionar que estes resultados constituem apenas uma aproximação, na medida em que incluem somente a influência do solvente e da água no equilíbrio de fases. É também de referir que uma fase de água pode existir como líquido sobrearrefecido até -38 °C à pressão atmosférica, se a nucleação for evitada [Weik, 2003]. Em todo o caso, a água da primeira camada de hidratação das proteínas não cristaliza [Rupley e Careri, 1991]. Assim, e uma vez que no presente estudo as enzimas se encontravam imersas numa fase não aquosa e se demonstrou que, nestas circunstâncias, não é termodinamicamente favorável a formação de uma monocamada completa de água em torno da superfície de uma proteína [Parker et al., 1995], as enzimas deverão ter estado sempre razoavelmente expostas ao solvente.

Outro aspecto a ter em conta é que a Figura 5.1 não reflecte apenas o impacto da diminuição da temperatura na actividade enzimática, mas inclui também o efeito da variação da temperatura na transferência de massa de solutos de e para o biocatalisador, quer no filme estagnado de fluido que rodeia as partículas (difusão externa), quer dentro do suporte poroso (caso do Novozym). A influência da transferência de massa é normalmente analisada com base no cálculo de parâmetros adimensionais que permitem comparar as velocidades de reacção e de difusão (módulo de Thiele, número de Biot, factor de efectividade). Com os dados cinéticos disponíveis, a forma mais conveniente de fazer esta análise é examinar a variação típica das constantes cinéticas e dos coeficientes de difusão

com a temperatura. Os coeficientes de difusão dos dois substratos a diluição infinita (as fracções molares do álcool e do éster não excederam 1.5 e 3.5 %, respectivamente) em *n*-hexano (Tabela 5.1) foram estimados através do método de Wilke-Chang [Reid et al., 1987]. Para este cálculo, estimou-se o volume molar do butirato de vinilo à temperatura de ebulição normal pelo método de Le Bas [Reid et al., 1987], sendo os valores das restantes propriedades retirados de uma base de dados [DIPPR801 Database]. A 35 °C, e dadas as velocidades de agitação utilizadas, não houve certamente limitações difusionais externas. Como se vê pela tabela 5.1, uma diminuição de temperatura de cerca de 50 °C conduziu a uma redução dos coeficientes de difusão de cerca de 50 %. Por outro lado, as constantes cinéticas exibem uma variação exponencial com a temperatura, de acordo com a lei de Arrhenius. É portanto razoável assumir que, apesar de as velocidades de difusão diminuírem com a diminuição de temperatura, a diminuição concomitante das velocidades de reacção será mais abrupta. Deste modo, o impacto da resistência à difusão será comparativamente menos significativo a baixa temperatura, sendo o processo controlado pela velocidade da reacção que é muito mais baixa nessas condições.

**Tabela 5.1** Efeito da temperatura nos coeficientes de difusão dos dois substratos a diluição infinita, em *n*-hexano.

|      | 2-fenil-1-propanol                 | butirato de vinilo                 |
|------|------------------------------------|------------------------------------|
| T/°C | $D_{AB}/\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ | $D_{AB}/\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ |
| 35   | 3.6E-05                            | 3.8E-05                            |
| 0    | 2.3E-05                            | 2.4E-05                            |
| -18  | 1.7E-05                            | 1.8E-05                            |

Na Tabela 5.2, mostra-se o impacto da variação da temperatura e do solvente na enantioselectividade, *E*, das duas enzimas. A 35 °C, já havia evidência de que *E* para a cutinase era sensivelmente o mesmo em *n*-hexano, no LI [C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>] e em acetonitrilo, independentemente do suporte de imobilização e de *a<sub>w</sub>* [Vidinha, 2004, Garcia et al., 2004, Garcia et al., 2005]. Em *n*-hexano, *E* aumentou com a diminuição da temperatura de 35 para 0 °C, mas manteve-se constante com uma diminuição adicional de temperatura de 25 °C. Este tipo de comportamento foi também verificado em [C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>]. Neste solvente,

deverá também ter-se registado um aumento de  $a_w$  com a diminuição da temperatura. De facto, dados de equilíbrio líquido-líquido para o sistema binário ( $[C_4mim][PF_6]$  + água) à pressão atmosférica [Anthony et al., 2001, Najdanovic-Visak et al., 2002] evidenciam uma diminuição da solubilidade mútua com a diminuição da temperatura. Para a composição de água no LI fixada pelo ajuste de  $a_w$  que se fez à temperatura ambiente, verifica-se que deverá ocorrer separação de fases a partir de 11 °C [Najdanovic-Visak et al., 2002], primeiro com estabelecimento de equilíbrio líquido-líquido até, pelo menos, 0 °C, e eventualmente com formação de água sólida a temperaturas mais negativas. É ainda de notar que a viscosidade dos LIs é bastante mais elevada do que a viscosidade dos solventes orgânicos. Em particular, a viscosidade do  $[C_4mim][PF_6]$  aumenta de cerca de 70 cP °C<sup>-1</sup> entre 35 e 0 °C [Tokuda et al., 2004], enquanto a viscosidade do *n*-hexano na mesma gama de temperatura aumenta apenas de cerca de 0,04 cP °C<sup>-1</sup> [DIPPR801 Database]. A -18 °C, foi impossível agitar o LI. Este facto poderia ter originado uma diminuição do valor de  $E$ , dado que, comparativamente, o enantiómero mais reactivo é mais afectado pela existência de limitações difusionais [Straathof e Jongejan, 1997]. No entanto, tal não se verificou, possivelmente porque a cutinase está imobilizada apenas à superfície do zeólito (único suporte utilizado no LI) e também porque o valor de  $E$  é pouco elevado. Em acetonitrilo,  $E$  não foi afectado pela temperatura. O solvente é uma das variáveis ajustáveis na determinação de condições experimentais que proporcionem valores de  $E$  elevados. A racionalização deste efeito teve várias abordagens, como a de Wescott et al. [1996] que utilizaram um modelo baseado na estrutura da enzima para determinar a parte do substrato que deixa de estar solvatada no estado de transição, e os coeficientes de actividade respectivos. Overbeeke et al. [2000] utilizaram misturas binárias de solventes e calcularam as contribuições entálpica e entrópica para a discriminação dos enantiómeros, em função da composição das misturas. Estes autores assumiram a existência de dois estados termodinâmicos distintos em equilíbrio, com valores de  $E$  diferentes, e conseguiram assim dar conta da ocorrência de valores extremos de  $E$  nas curvas de  $E$  em função da composição do solvente. Tal como este estudo exemplifica, em solventes diferentes a resposta de  $E$  à temperatura pode ser muito diferente. No caso do sistema binário (acetonitrilo + água), um valor de  $a_w$  de 0,7 corresponde a uma fracção molar de água, à temperatura ambiente, de aproximadamente 0,18 [Sazonov e Shaw, 2002]. Para esta

composição, o sistema permanece monofásico até  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  [Pence e Gu, 1996]. Nestas condições, e aplicando o modelo apresentado por Bell et al. [1997], é possível prever que, quando a temperatura diminui de 25 para  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $a_w$  aumente para 0,77.

**Tabela 5.2** Efeito da temperatura e do solvente na enantioselectividade da cutinase e da CALB.

| T/ $^{\circ}\text{C}$ | E, cutinase      |  |               | E, CALB          |               |
|-----------------------|------------------|--|---------------|------------------|---------------|
|                       | <i>n</i> -hexano | [C <sub>4</sub> mim][PF <sub>6</sub> ] | acetonitrilo  | <i>n</i> -hexano | acetonitrilo  |
| 35                    | $2,0 \pm 0,2$    | $2,1 \pm 0,2$                          | $2,1 \pm 0,1$ | $2,2 \pm 0,2$    | $2,0 \pm 0,2$ |
| 0                     | $4,5 \pm 0,4$    |  | $2,0 \pm 0,2$ | $4,8 \pm 0,6$    | $2,0 \pm 0,2$ |
| $-18$                 | $4,7 \pm 0,7$    | $4,6 \pm 0,5$                          | $2,0 \pm 0,2$ | $8,5 \pm 0,9$    | $2,3 \pm 0,3$ |
| $-25$                 | $4,6 \pm 0,5$    |  |               | $> 10$           |               |

A sensibilidade da enantioselectividade da CALB à temperatura é conhecida. Embora em acetonitrilo E se tenha mantido constante, tal como para a cutinase, em *n*-hexano obteve-se uma variação linear de  $\ln E$  com  $1/T$  que conduziu a valores de  $\Delta\Delta H^{\#}$  e  $\Delta\Delta S^{\#}$  de  $-18\text{ kJ mol}^{-1}$  e  $-52\text{ J K}^{-1}\text{ mol}^{-1}$ , respectivamente. Ou seja, o enantiómero favorecido pela entalpia é desfavorecido pela entropia, e vice-versa [Ottosson et al. 2001], o que está de acordo com os resultados indicados por Ljubovic et al. [1999] e Irimescu et al. [2004] para a CALB. Irimescu et al. [2004], em particular, determinaram valores de E a 25 e  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  para a resolução do 2-fenil-1-propanol com um agente acilante diferente do utilizado no presente trabalho e observaram um aumento de E para cerca do dobro com o abaixamento da temperatura. Não se fizeram ensaios com a CALB em [C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>] a baixa temperatura por se ter verificado num estudo anterior [Garcia et al., 2004] que as velocidades iniciais para a CALB na presente reacção eram muito mais baixas do que em *n*-hexano. Este facto e o aumento considerável de velocidade registado quando o LI estava saturado com CO<sub>2</sub> sugeriram a existência de limitações difusionais internas.

Por que razão E da cutinase em *n*-hexano aumentou apenas com a diminuição de temperatura até  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ao contrário do que sucedeu com a CALB? Os resultados obtidos em *n*-hexano e em [C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>], que evidenciam uma diminuição de E com o aumento de T, sugerem que as experiências foram realizadas a  $T < T_r$ . A teoria do estado de transição não

prevê a existência de mais do que uma temperatura de inversão. Tal como foi observado por Holmberg e Hult [1991], a relação entre E e T prevista pela teoria pressupõe que não há uma alteração substancial da conformação da enzima na gama de temperaturas testada. Assim, uma hipótese para explicar o impacto de T em E para a cutinase em *n*-hexano seria a ocorrência de algum fenómeno a nível da conformação da enzima. Contudo, se tal tiver acontecido, não se reflectiu de forma equivalente na actividade da cutinase que, como se viu atrás, manteve uma actividade residual elevada, mesmo mais elevada do que a exibida pela CALB às temperaturas mais baixas de trabalho. É de notar que há evidência de que o congelamento de uma fase aquosa pode causar alterações conformacionais com prejuízo da eficiência catalítica das enzimas [Terefe et al., 2004]. Este estudo foi realizado em meio aquoso, em condições muito diferentes, portanto, daquelas a que a enzima está submetida no presente trabalho. No entanto, o comportamento exibido pelas duas enzimas poderá também reflectir em certa medida este tipo de efeito.

## 5.5 CONCLUSÃO

A temperatura pode afectar de uma forma importante o resultado das reacções assimétricas, não só pelo efeito que pode ter no grau de pureza enantiomérica dos compostos obtidos, mas também pelo impacto que pode ter ao nível da preferência da enzima por um ou outro dos enantiómeros. Este aspecto tem sido explorado quer na síntese enzimática, quer não enzimática [James et al., 2005]. O presente estudo teve como objectivo principal a análise do impacto da temperatura na enantioselectividade da cutinase. Desse ponto de vista, levantaram-se questões interessantes, como a forma como o solvente pode mediar a influência de T em E, mas sobretudo o impacto que T teve em E em *n*-hexano, manifestado num aumento de E da cutinase com a diminuição de T até 0 °C, mas sem expressão para temperaturas inferiores. Seria muito útil dispor de dados de modelação molecular que pudessem elucidar os resultados obtidos, e outros obtidos na extensão do presente estudo a mais substratos e solventes. A utilização de mutantes da cutinase poderia também contribuir de uma forma importante para clarificar a relação entre a estrutura e a enantioselectividade da enzima.

## **AGRADECIMENTOS**

Este trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia e pelo FEDER. Agradece-se o apoio do Ricardo Baptista na produção da cutinase. Agradece-se à Novo Nordisk Bioindustrial, Espanha, a oferta da Novozym.



## **CAPÍTULO 6**

### **Conclusão Geral**



## 6 CONCLUSÃO GERAL

A BSNA requer uma aproximação multidisciplinar que integra uma série de conhecimentos/contribuições, nomeadamente na concepção do biocatalisador “ideal”, por via de processos de imobilização mais adequados e/ou utilização de “novas” enzimas obtidas por selecção de enzimas já existentes na natureza ou obtidas por mutagénese, na concepção/desenvolvimento de um reactor apropriado e operações de separação eficazes, e na escolha de um solvente apropriado. Este último aspecto, que faz parte integrante da vulgarmente designada engenharia de meio, é cada vez mais alvo de atenção, nomeadamente no que respeita à procura de solventes alternativos que não coloquem os problemas ambientais associados aos tradicionais solventes orgânicos. Enquadra-se nesta estratégia a utilização de solventes ambientalmente sustentáveis, solventes “verdes” como os fluidos-sc e os LIs.

Na escolha do solvente que melhor se adequa a cada processo, é necessário entrar em linha de conta com aspectos como a solvatação de substratos e produtos, eventuais efeitos directos do solvente na enzima, formas de assegurar e controlar  $a_w$ , o estado de ionização da enzima e a forma de dispersar a enzima no meio. É sobre estes tópicos que a presente dissertação se debruça, no sentido em que procura aprofundar o conhecimento sobre a influência e o modo como estes parâmetros interagem, no contexto da BSNA em solventes “verdes”. Com a análise do comportamento de enzimas em condições comparáveis em LIs, fluidos-sc e solventes orgânicos, pretende-se constituir uma base mais sólida para otimizar o funcionamento das enzimas nesses meios, que permita olhar de uma forma mais fundamentada para as opções disponíveis.

Pelos estudos efectuados, verificou-se que:

- (i) A actividade de transesterificação da cutinase aumentou com o aumento de  $a_w$  quando o valor deste parâmetro subiu de 0,2 para 0,7, em *n*-hexano, etano-sc e CO<sub>2</sub>-sc, acontecendo o inverso em acetonitrilo. A actividade de hidrólise da cutinase aumentou com o aumento de  $a_w$  em qualquer dos solventes testados, mas foi muito

mais elevada em acetonitrilo. Entre estes quatro solventes, o acetonitrilo é o único que é miscível com a água. Comparativamente, o mesmo valor de  $a_w$  corresponde, em acetonitrilo, a um número muito maior de moléculas de água do que nos outros três solventes. Este facto poderia não só explicar os níveis de hidrólise registados no acetonitrilo, como as velocidades de transesterificação mais baixas devido à competição mais acentuada com a hidrólise. No entanto, em LIs, a cutinase foi activada, em termos de transesterificação e hidrólise, pelo aumento de  $a_w$  nos três LIs testados, quer nos que são imiscíveis com a água ( $[C_4mim][PF_6]$  e  $[C_8mim][PF_6]$ ), quer no que é miscível com a água ( $[C_4mim][BF_4]$ ). A  $a_w = 0,7$ , este último solvente tem uma concentração de água superior à do acetonitrilo para o mesmo valor de  $a_w$ . A actividade de transesterificação da cutinase foi mais elevada nos dois LIs imiscíveis com a água do que no terceiro. Em particular, as velocidades de transesterificação da cutinase foram muito semelhantes em *n*-hexano, etano-sc e  $[C_4mim][PF_6]$ .

- (ii) A CALB foi desactivada pelo aumento de  $a_w$  quando o valor deste parâmetro subiu de 0,2 para 0,7, em qualquer dos solventes testados (orgânicos, supercríticos, LIs). Mesmo os níveis de hidrólise baixaram com o aumento de  $a_w$ , revelando uma diminuição global da competência catalítica desta enzima.
- (iii) Os perfis de actividade da cutinase em função de  $a_w$  foram semelhantes quando a cutinase se encontrava imobilizada nos zeólitos NaY ou NaA. As diferenças registadas deverão reflectir diferenças nas interacções enzima/suporte.
- (iv) A cutinase foi pouco sensível a variações do estado de ionização impostas por tampões ácido-base, embora em *n*-hexano e etano-sc se notasse algum efeito menos favorável dos tampões que tinham os valores mais extremos de  $pK_a$  em meio aquoso. Surgiu, no entanto, uma situação invulgar com a cutinase imobilizada no zeólito NaA, em etano-sc, em que mesmo a presença de um tampão relativamente ácido conseguiu aumentar a velocidade inicial de transesterificação para níveis semelhantes aos obtidos em *n*-hexano. A explicação poderá ser o nível de hidrólise mais elevado registado no zeólito NaA, o facto do coeficiente de actividade para o ácido butírico em etano-sc ser mais elevado do que em *n*-hexano, sugerindo assim uma maior

disponibilidade do ácido para a enzima em etano-sc, o facto de a percentagem de imobilização da cutinase no zeólito NaA ser menos elevada do que no zeólito NaY, e ainda o facto de o zeólito NaA ser mais hidrofílico, e ter maior apetência para fixar o ácido. Em acetonitrilo, a cutinase foi insensível a qualquer manipulação das condições ácido-base do meio, possivelmente devido à maior polaridade do meio.

- (v) A estabilização dos substratos no solvente era maior no *n*-hexano do que no etano-sc, e ainda maior no acetonitrilo, tal como indicado pelos coeficientes de actividade calculados para os substratos. Os resultados destes cálculos estão em bom acordo com as actividades de transesterificação mais elevadas que se registaram para a cutinase em etano-sc do que em *n*-hexano, e com as actividades cerca de uma ordem de grandeza mais baixas observadas em acetonitrilo. O cálculo efectuado em CO<sub>2</sub>-sc sugeria uma solvatação compatível com uma razoável tendência dos substratos acederem ao centro activo da enzima, e portanto velocidades de transesterificação elevadas, ao contrário do que se observou. Esta constituiu mais uma evidência para o efeito directo negativo do CO<sub>2</sub> sobre uma enzima. De facto, a CALB exibiu uma actividade de transesterificação tão elevada em CO<sub>2</sub>-sc quanto em *n*-hexano ou etano-sc, em bom acordo com as semelhanças de solvatação nestes três solventes que os cálculos de coeficientes de actividade revelaram.
- (vi) A CALB exibiu uma actividade diminuída nos LIs. Este facto poderá ter sido devido à existência de limitações difusionais internas resultantes da elevada viscosidade dos LIs relativamente aos outros solventes testados, não existentes no caso da cutinase que apenas se encontrava imobilizada à superfície dos suportes de imobilização. O facto de se estar a comparar o comportamento de duas enzimas nos mesmos LIs permitiu eliminar a hipótese de que estes resultados se devessem a questões de solvatação. No entanto, o facto de a CALB ter exibido uma actividade mais elevada em [C<sub>8</sub>mim][PF<sub>6</sub>] do que em [C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>], ao contrário da cutinase, sendo o LI [C<sub>8</sub>mim][PF<sub>6</sub>] o mais viscoso dos três LIs utilizados, indica que os resultados registados não reflectem apenas a influência de limitações difusionais.
- (vii) Uma lacuna da presente dissertação é a falta de dados termodinâmicos que possam clarificar o papel da solvatação nos LIs. Espera-se que seja em breve possível dispor

de ferramentas de cálculo para tal, a exemplo daquelas que estão acessíveis para solventes orgânicos e fluidos-sc.

- (viii) No sistema combinado LI/CO<sub>2</sub>-sc, a presença do LI evitou que o CO<sub>2</sub> exercesse o seu efeito negativo sobre a cutinase que as alternativas de imobilização testadas não solucionaram. Obtiveram-se mesmo velocidades de transesterificação mais elevadas do que no LI sozinho, o que poderá ter sido devido ao efeito, a nível da solvatação dos substratos, da elevada concentração de CO<sub>2</sub> dissolvido no LI. No caso da CALB, os aumentos de actividade registados foram ainda mais acentuados. Este facto poderá ter tido como causas adicionais o alívio das limitações difusionais devido à diminuição da viscosidade dos LIs contendo elevadas concentrações de CO<sub>2</sub>, e ainda uma redução do valor de  $a_w$  que é favorável à CALB.
- (ix) O sistema combinado LI/CO<sub>2</sub>-sc revelou-se uma alternativa muito interessante para a biocatálise, possibilitando uma integração de processos em solventes ambientalmente favoráveis. Desenvolvimentos futuros poderão incluir processos de separação baseados em diferenças de pressão e suportados em estudos de equilíbrios de fase, ou envolvendo membranas.
- (x) A temperaturas inferiores a 0 °C, a cutinase e a CALB exibiram actividades não desprezáveis em *n*-hexano. A 0 e -18 °C, a cutinase exibiu cerca de 50 e 20 % da actividade exibida a 35 °C, respectivamente, valores que desceram para cerca de 30 e 10 % no caso da CALB. O cálculo dos coeficientes de difusão a diluição infinita dos dois substratos naquele solvente permitiu confirmar que, partindo de uma situação a 35 °C em que não haja resistências à transferência de massa, que é seguramente o caso da cutinase, então a -18 °C haverá ainda menos razões para que as limitações difusionais externas mascarem a variação das constantes cinéticas com T. A diminuição de T não afectou substancialmente a razão das velocidades de transesterificação e de hidrólise para as duas enzimas.
- (xi) Confirmou-se que a temperatura constitui mais uma variável a ajustar no controle da enantioselectividade (E) enzimática. Com a cutinase, observou-se um aumento de E com a diminuição de T de 35 para 0 °C, em *n*-hexano. Entre 0 e -25 °C, não se

observou nenhuma variação adicional de  $E$ . Esta tendência foi confirmada em  $[\text{C}_4\text{mim}][\text{PF}_6]$ , solvente no qual  $E$  a 35 °C foi igual a  $E$  em  $n$ -hexano ao mesmo valor de  $T$ , e  $E$  a -18 °C foi igual a  $E$  obtido em  $n$ -hexano a  $T$  igual ou inferior a 0 °C, apesar de ser muito provável a existência de limitações difusionais externas no LI cuja viscosidade aumenta extraordinariamente com a diminuição de  $T$ . Já a CALB exibiu valores de  $E$  que variaram progressivamente com a diminuição de  $T$ , originando uma variação linear de  $\ln E$  com o inverso de  $T$ . Em acetonitrilo, a discriminação dos enantiómeros relativamente às duas enzimas foi a mesma a qualquer dos valores de  $T$  testados, evidenciando a influência do solvente em  $E$ . É de referir que muito provavelmente a água solidificou no  $n$ -hexano e no  $[\text{C}_4\text{mim}][\text{PF}_6]$  às temperaturas mais baixas testadas, o que no entanto não parece ter afectado significativamente a influência de  $T$  quer na actividade das enzimas, quer em  $E$ , pelo menos a julgar pelo comportamento registado com a CALB.

- (xii) Seria muito interessante dispor de dados de modelação molecular que pudessem clarificar a variação da enantioselectividade da cutinase com a variação da temperatura e do solvente. Nesse sentido, seria útil fazer a extensão do estudo já realizado de modo a incluir mais substratos, e ainda utilizar mutantes da cutinase, de modo a elucidar a relação entre a estrutura da enzima e  $E$ .





## **CAPÍTULO 7**

### **Referências Bibliográficas**



## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

### A

- Adlerceurtz, P.**, *Eur.J. Biochem.* **1991**, 199,609–614.
- Affleck, R.**, Xu, Z.F., Suzawa, V., Focht, K., Clark, D.S., Dordick, J.S., *Proc .Natl. Acad. Sci. USA*, **1992**, 89, 1100–1104.
- Almeida, M. C.**, Ruivo, R., Maia, C., Freire, L., Corrêa de Sampaio, T. e Barreiros, S., *Enzyme Microb. Tech.*, **1998**, 22, 494–499.
- Anderson, E.M.**, Larsson, K. M., Kirk, O., *Biocat. Biotransfrom.*, **1998**, 16, 181–204.
- Andrich, G.**, Nesti, U., Ventu.i, R., Zinnai, A., Fiorentini R., *Eur. J. Lipid Sci. Tech.*, **2005**, 107, 381–386.
- Anthony, J. L.**, Maginn, E. J., Brennecke, J. F., *J. Phys. Chem. B.*, **2002**, 106, 7315–7320.
- Anthony, J. L.**, Maginn, E. J., Brennecke, J. F., *J. Phys. Chem. B.*, **2001**, 105, 10942–10949.
- Aoyagu, Y.**, Saitoh Y., Ueno, T., Horiguchi, M., Takeya, *J. Org .Chem*, **2003**, 69, 6899-6904.

### B

- Bell, G.**, Janssen, A.E.M., Halling, P.J., *Enzyme Microb. Tech.*, **1997**, 20, 471–477.
- Bell, G.**, Halling, P.J., Moore, B.D., Partridge, J., D.G. Rees, *Trend Biotechnol.*, **1995**, 13, 468–473.
- Berberich, J. A.**, Kaar, J. L., Russell, A. J., *Biotechnol. Progr.*, **2003**, 19,1029–1032.
- Bertau, M.**, *Curr. Org. Chem.*, **2002**, 6, 987–1014.
- Blackwood, A. D.**, Moore, B.D., Halling, P.J., *Biochim. Biophys. Act.*,**1993**, 1206, 161–165.
- Blanchard, L. A.**, **Brennecke, J. F.**, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **2001**, 40, 287–292.
- Blanchard, L. A.**, Gu, Z., Brennecke, J. F., *J. Phys. Chem. B.*, **2001**, 105, 2437–2444.
- Blanchard, L. A.**, Hancu, D., Beckman, E. J., Brennecke, J. F., *Nature*, **1999**, 399, 28–29.

- Boller, T.**, Meier, C., Menzler, S., *Org. Process Res. Dev.*, **2002**, 6, 4, 509–519.
- Boonyaratanakornkit, B. B.**, Park, C. B., Clark, D. S., *Biochim. Biophys. Acta*, **2002**, 1595, 235–249.
- Bortolini, O.**, Campestrini, S., Conte, V., Fantin, G., Fogagnolo, M., Maietti, S., *Eur. J. Org. Chem.*, **2003**, 4804–4809.
- Borges de Carvalho, I.**, Corrêa de Sampaio, T., Barreiros, S., *Biotechnol. Bioeng.*, **1996** 49, 399–404.
- Bosley, J. A., Clayton, J.C.**, *Biotechnol. Bioeng.*, **1994**, 43, 934–938.
- Bösmann, A.**, Franciò, G., Janssen, E., Solinas, M., Leitner, W., Wasserscheid, P., *Angew. Chem., Int. Edit.*, **2001**, 40, 2697–2699.
- Branco, L. C.**, Rosa, J. N. J., Moura Ramos J., Afonso, C. A. M., *Chem.–Eur. J.*, **2002**, 8, 3671–3677.
- Brown, A.**, Pollett, P., McKoon, E., Eckert, C. A., Liott, C. L., Jessop, P. G., *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 123, 1254–1255.
- Brzozowski, A.M.**, Derewenda, U., Derewenda, Z. S., Ddoson, E., Lawson, D. M., Turkemburg, J.,P, *Nature*, **1991**, 351, 491–494.
- C**
- Cabral, J. M. S.**, Gama, M., Aires–Barros, M. R., in “Engenharia Enzimática”, Cabral, J. M. S, Aires–Barros, M. R., Gama, M., ed., Lidel, Portugal, **2003**, 1–12.
- Cainelli, G.**, De Matteis, V., Galletti, P., Giacomini, D., Orioli, P., *Chem. Commun.*, **2000**, 2351–2352.
- Cansell, F.**, Aymonier, C., Loppinet-Serani, A., *Curr. Opin. Solid St. M.*, **2003**, 7, 331–340.
- Cao, Y. P.**, Lim, G. O., Lui, X. Y., Dimg, X. B., Peng, Y. X., Chan, A. S. C., *New J. Chem.*, **2003**, 27, 7, 1065–1069.
- Carvalho, C. M. L.**, Aires–Barros M. R., e. Cabral, J. M. S, *Biotechnol. Bioeng.*, **1999**, 66, 17–34.
- Casimiro, T.**, Banet–Osuna, A. M., Ramos, A. M., da Ponte M. N., Aguiar–Ricardo A., *Eur. Polym. J.*, **2005**, 41 1947–1953.
- Chamouleau, F.**, Coulon, D., Girardin, M., Ghoul, M., *J. Mol. Catal. B–Enzym.*, **2001**, 11, 949–954.

**Chikusa, Y.**, Hirayama, Y., Ikunaka, M., Inoue, T., Kamiyama, S., Moriwaki, M., Nishimoto, Y., Nomoto, F., Ogawa, K., Ohno, T., Otsuka, K., Sakota, A. K., Shirasaka, N., Uzura, A., Uzura, K., *Org. Process Res. Dev.*, **2003**, 7, 289–296.

**Colacino, F., Crichton, R.R.**, *Biotechnol. Genet. Eng.*, **1997**, 14, 211–277.

**Corrêa de Sampaio, T.**, Melo, R. B., Moura, T. F., Michel, S., Barreiros, S., *Biotechnol. Bioeng.*, **1996**, 50, 257–264.

**Cull, G. S.**, Holbrey, J. D., Vargas-Mora, V., Seddon, K. R., Lye, G. J., *Biotechnol. Bioeng.*, **2000**, 69, 227–233.

## D

**Daggett, V.**, Schrader, S., Kollman, P., *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113, 8926–8935.

**Dahl, S.**, Fredenslund, A., Rasmussen, P., *Ind. Eng. Chem. Res.*, **1991**, 30, 1936–1945.

**Dahl, S.**, Michelsen, M. L., *Fluid Phase Equilib.*, **1990**, 36, 1829–1836.

**Davis, J. H., Fox, P. A.**, *Chem. Commun.*, **2003**, 1209–1212.

**De Diego, T.**, Lozano, P., Gmouh, S., Vaultier, M., Iborra, J. L., *Biomacromolecules*, **2005**, 6, 1457–1464.

**De Diego, T.**, Lozano, P., Gmouh, S., Vaultier, M., Iborra, J. L., *Biotechnol. Bioeng.*, **2004**, 88, 7, 916–924.

**DeSimone J.M.**, *Science*, **2002**, 297, 799–803.

**DIPPR801 Database**, Public Release **1998**, (<http://dippr.byu.edu/database.asp>).

**Dordick, J. S.**, *Enzyme Microb. Tech.*, **1989**, 11, 194–211.

**Dossat, V.**, Combes, D., Marty, A., *Enzyme Microb. Tech.*, **1999**, 25, 194–200.

**Douzou, P.**, Sireix, R., Travers, F., *P Natl Acad Sci USA*, **1970**, 66, 3, 787–792.

**Duarte, A. R. C.**, Santiago, S., de Sousa, H. C., Duarte, C. M. M., *J. Chem. Eng. Data*, **2005**, 50, 216–220.

**Dupont J.**, Consorti C. S., Suarez, P. A. Z., Souza, R. F., Fulmer, S. L., Richardson, D. P., Smith T. E., Wolff, S., *Org. Synth.*, **2002**, 79, 236–243.

**Dzyuba, S.V., Bartsch, R.A.**, *Angew. Chem. Int. Edit.*, **2003**, 42, 148–150.

## E

- Erbeldinger, M.**, Mesiano, A. J., Russell, A. J., *Biotechnol. Progr.*, **2000**, 16, 1129–1131.
- Eggert, T.**, Leggewie, C., Puls, M., Streit, W., Pouderoyen G. V., Dijkstra, B. W., Jaeger, K-E., *Biocatal. Biotransorf.*, **2004**, 22, 2, 139–144.
- Ema, T.**, *Tetrahedron-Asymmetr.*, **2004**, 15, 2765–2770
- Erkey, C.**, *J. Supercrit. Fluid.*, **2000**, 17, 259–287.

## F

- Fitzpatrick, P.A.**, Steinmetz, A.C.U., Ringe, D., Klibanov, A.M, *P. Natl. Acad. Sci USA*, **1993**, 90 8653–8657.
- Fontes, N.**, Halling, P.J., Barreiros, S., *Enzyme Microb. Tech.*, **2003 a**, 33, 938–941.
- Fontes, N.**, Harper, N., Halling, P.J., Barreiros, S., *Biotechnol. Bioeng.*, **2003 b**, 82, 802–808.
- Fontes, N.**, Partridge, J., Halling, P.J., Barreiros, S., *Biotechnol. Bioeng.*, **2002**, 77, 296–305.
- Fontes, N.**, Almeida, M.C., Garcia, S., Peres, C., Partridge, J., Halling, P.J., Barreiros, S., *Biotechnol. Progr.*, **2001 a**, 17, 355–358.
- Fontes, N.**, Almeida, M.C., Barreiros, S., in: *E.N. Vulfson, P.J. Halling, H.L. Holland (Eds.), Methods in Biotechnology*, **2001 b** , Vol. 15, Humana Press, New Jersey, 565–573.
- Fontes, N.**, Nogueiro, E., Elvas, A.M., Corrêa de Sampaio, T., Barreiros, S., *Biochim. Biophys. Acta*, **1998 a**, 1383, 165–174.
- Fontes, N.**, Almeida, M.C, Peres, C., Garcia, S., Grave, J., Aires-Barros, M. R., Soares, C. M., Cabral, J.M.S., Maycock, C. D., Barreiros, S., *Ind. Eng. Chem. Res.*, **1998 b**, 37, 3189–3194.
- Freemantle, M.**, *Chem. Eng. News.*, **2001**, January 1, 21–25.

## G

- Garcia, S.**, Vidinha, P., Arvana, H., Gomes da Silva, M. D. R., Ferreira, M. O., Cabral, J. M. S., Macedo, E. A., Harper N., Barreiros, S., *J. Supercrit. Fluid*, **2005**, 35, 62–69.
- Garcia, S.**, Lourenço, N. M. T., Lousa D., Sequeira, A. F., Mimoso, P., Cabral, J. M. S., Afonso, C. A. M., Barreiros, S , *Green Chem*, **2004**, 6, 466 –470.

**Georlette, D.**, Blaise, V., Collins, T., D'Amico, S., Gratia, E., Hoyoux, A., Marx, J.-C., Sonan, G., Feller, G., Gerday, C., *FEMS Microbiol. Rev.*, **2004**, 28, 25–42.

**Georlette, D.**, Damien, B., Blaise, V., Depiereux, E., Uversky, V. N., Gerday, C., Feller, G., *J. Biol. Chem.*, **2003**, 278, 39, 37015–37023.

**Ghanem, A., Aboul-Enain, H. Y.**, *Chirality*, **2005**, 17:1–15.

**Gonçalves, A. P. V.**, Lopes, J. M., Lemos, F., Ramôa Ribeiro, F., Prazeres, D. M. F., Cabral, J. M. S. e Aires-Barros, M. R., *Enzyme Microb. Tech.*, **1997**, 20, 93–101.

**Gonçalves, A. P. V.**, Madeira Lopes, J. M., Lemos, F., Ramôa Ribeiro, F., Prazeres, D. M. F., Cabral, J. M. S., Aires-Barros, M. R., *J. Mol. Catal. B. Enzym.*, **1996**, 1, 53–60.

**Gordon, C., M.**, *Appl. Catal. A-Gen.*, **2001**, 222, 101–117.

**Greenspan, L.**, *J. Res. Nat. Bur. Stand. – A. Phys. Chem.*, **1977**, 81A, 89–96.

**Griebenow, K., Klibanov, A.M.**, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 47, 11695–11700.

## H

**Handy, S. T.**, *Chem.–Eur. J.*, **2003**, 9, 2938–2944.

**Hammond, D. A.**, Karel, M., Klibanov, A. M., Krukonis, V. J., *Appl. Biochem. Biotech.*, **1985**, 11, 393–400.

**Haefner, F.**, Torbjorn, N., Hult, K. *Bioph. J.*, **1998**, 74, 1251–1262.

**Hakuta, Y.**, Hayashi, H., Arai, K. *Curr. Opin. S. T. M. Sci.*, **2003**, 7, 341–351.

**Halling, P.J.**, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2000**, 4, 74–80.

**Halling, P.J.**, Blackwood A. D., More B. D., **1996**, *Ann. NY. Acad. Sci.*, 799, 251–256.

**Halling, P.J.**, *Enzyme Microb. Tech.*, **1994**, 16, 178–206.

**Halling, P.J.**, *Biotechnol. Techniques*, **1992**, 6, 271–276.

**Harper, N., Barreiros, S.**, *Biotechnol. Progr.*, **2002**, 18, 1451–1454.

**Harper, N.**, Dolman, M., Moore, B.D., Halling, P.J., *Chem–Eur. J.*, **2000**, 6, 1923–1929.

**Hedstrom, L.**, *Chem. Rev.*, **2002**, 102, 4501–4523.

**Holmberg, H., Hult, K.,** *Biotechnol. Lett.*, **1991**, 13, 323–326.

**Hoyoux A.,** Blaise, V., Collins, T., D'amico, S., Gratia, E., Huston, A. L., Marx, J.– C., Sonan, G., Zeng, Y. Feller, G., Gerday, C., *J. Biosci. Bioeng.*, **2004**, 98, 5, 317–330.

**Huddleston, J. G.,** Visser, A. E., Reichert, W. M., Willauer, H. D., Broker, G. A., Rogers, R. D., *Green Chem.*, **2001**, 3, 156–164.

**Huisman, G., Sligar, S. G.,** *Curr. Opin. Biotech.*, **2003**, 14:357–359.

**Hult, K., Berglund, P.** *Curr. Opin. Biotech.*, **2003**, 14, 395–400.

## I

**Irimescu, R.,** Saito, T., Kato, K., *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2004**, 27, 69–73.

**Ishida, Y.,** Miyauchi, H., Saigo, K., *Chem. Commun.*, **2002**, 2240–2241.

**Itoh, T.,** Akasaki, E., Kudo, K., Shirakami, S., *Chem. Lett.*, **2001**, 262–263.

## J

**Jaeger, K-E., Eggert, T.,** *Curr. Opin. Biotech.*, **2002**, 13, 390–397.

**James, P.,** Felpin, F-X, Landais, Y., Schenk, K., *J. Org. Chem.*, **2005**, 70, 7985-7995.

**Jastorff, B.,** Mölter, K., Behrend, P., Bottin-Weber, U., Filser, J., Heimers, A., Ondruschka, B., Ranke, J., Schaefer, M., Schröder, H., Stark, A., Stepnowski, P., Stock, F., Strömann, R., Stolte, S., Welz-Biermann, U., Ziegerta, S., Thöming, J., *Green Chem.*, **2005**, 7, 362–372.

**Jastorff, B.,** Störmann R., Ranke, J., Mölter, K., Stock, F., Oberheitmann, B., Hoffmann, W., Nüchter, M., Ondruschka, B., Filser, J., *Green. Chem.*, **2003**, 5, 136–142.

## K

**Kaar, J. L.,** Jesionowski, A., M, Berberich, J. A., Moulton, R.; Russell, A. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 4125–4131.

**Kamat, S.V.,** Beckman, E.J., Russel, A.J. L, *Crit. Rev. Biotechnol.*, **1995**, 15, 41–71.

**Kamat, S.V.,** Iwaskewyz, B., Beckman, E.J., Russel, A.J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 19, 8845.

**Kawanam, H.,** Sasaki, A., Matsui, K., Ikushima, Y., *Chem. Commun.*, **2003**, 896–897.



- Kazarian, S. G.**, Briscoe, B. J., Welton, T., *Chem. Commun.*, **2000**, 2047–2048.
- Keinan, K.**, Hafeli, E. K., Seth, K. K., Lamed, R., *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, 108, 106–169.
- Kim, J.**, Clark, D.S., Dordick, J.S., *Biotechnol. Bioeng.*, **2000**, 67, 112–116.
- Kim, J., Dordick, J.S.** *Biotechnol. Bioeng.*, **1993**, 42, 772–776.
- Kirk, O.**, Borchert, T. V., Fuglsang, C. C., *Curr. Opin. Biotech.*, **2002**, 13, 345–351.
- Klibanov, A.M.**, *Nature*, **2001**, 409, 241–246.
- Klibanov, A.M.**, *Trends Biotechnol.*, **1997**, 15, 97–101.
- Klibanov, A.M.**, *Trends Biochem Sci.*, **1989**, 141–144.
- Knezevic, Z.**, Mojovic, L., Adnadjevic, B., *Enzyme. Microb. Tech.*, **1998**, 22, 275–280.
- Kosugi, Y.**, Takahashi K, Lopez C, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1995**, 72, 11, 1281–1285.
- Krishna, S. H.**, *Biotechnol. Adv.*, **2002**, 20, 239–266.
- L**
- Laane, C.**, Boren, S., Vos, K., Veege, C., *Biotechnol. Bioeng.*, **1987**, 30, 81–87.
- Lam, L. K. P.**, Hui, R. A. H. F., Bryan Jones, J. *J. Org. Chem.*, **1986**, 51, 2047–2050.
- Larsen, B.L.**, Rasmussen, P., Fredenslund, A., *Ind. Eng. Chem. Res.*, **1987**, 26, 2274–2286.
- Laszlo, J. A.**, Compton, D. L., *Biotechnol. Bioeng.*, **2001**, 75, 181–186.
- Lau, R. M.**, Rantwijk, V., F., Seddon, K. R., Sheldon, R. A., *Org. Lett.*, **2000**, 2, 4189–4191.
- Lauwereys, M.**, Geus, P., Meutter, J., Stanssens, P., Matthyssens, G., *Lipases: Structure, Mechanism and Genetic Engineering*, L. Alberghina, R. D. Schmid and R. Verger, VCH, New York, **1990**, 243–251
- Lee, K. K., Parking, K. L.**, *Biotechnol. Bioeng.*, **2001**, 5, 219–227.
- Liu, F.**, Abram, M. B., Tom Baker, R., Tumas, W., *Chem. Commun.*, **2001**, 433–434.
- Ljubovic, E.**, Majerić–Elenkov, M., Avadagić, A., Sunjić, V., *Food Technol. Biotech.*, **1999**, 37, 3, 215–224.
- Lowry, O. H.**, Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J., *J. Biol. Chem.*, **1951**, 193, 265–275.

**Lozano, P.**, de Diego T., Carrié, D., Vaultier, M., Iborra, J. L., *J. Mol. Catal. A – Chem.*, **2004**, 214, 113–119.

**Lozano, P.**, de Diego T., Carrié, D., Vaultier, M., Iborra, J. L., *Biotechnol. Prog.*, **2003**, 19, 380–382.

**Lozano, P.**, de Diego, T., Carrié, D., Vaultier, M., Iborra, J. L., *Chem. Commun.*, **2002**, 692–693.

**Lutz, S.**, *Tetrahedron-Asymmetr.*, **2004**, 15, 2743–2748.

**Lutz, S., Patrick, W. M.**, *Curr. Opin. Biotech.* **2004**, 15, 1–7.

## M

**Ma, L.**, Person, M., Adlercreutz, P., *Enzyme Microb. Tech.*, **2002**, 31, 1024–1029.

**Marsal, A.**, Celma P.J., Cot J., Cequier, M., *J. Supercrit. Fluid*, **2000**, 16, 217–223.

**Marty, A.**, Chulalaksananukul, W., Willemot, R. M., Condoret, J. S., *Biotechnol. Bioeng.*, **1992**, 39, 3, 273–280.

**McMinn, J.H.**, Sowa, M. J., Charnick, S. B., Paulaitis, M. E., *Biopolymers*, **1993**, 33, 1213–1224.

**Mesiano, A. J.**, Beckman E. J., Russell, A. J., *Chem. Rev.*, **1999**, 99, 623–633.

**Micaelo, N. M.**, Teixeira, V. H., Baptista, A. M., Soares, C. M., *Biophys. J.*, **2005**, 89, 999–1008.

**Milewska, A.**, Osuna, A. M. B., Fonseca, I. M., da Ponte, M. N., *Green Chem.*, **2005**, 7, 726–732.

**Miyazawa, T.**, Minowa, H., Miyamoto, T., Imagawa, K., Yanagihara, R., Yamada, T., *Tetrahedron-Asymmetr.*, **1997**, 8, 3, 367–370.

**Mohanty, S., McCormick, A.V.**, *Chem. Eng. J.*, **1999**, 74, 1–14.

**Moner-Girona, M.**, Roig, A., Molins, E., *J. Sol–Gel Sci Techn.*, **2003**, 26, 645–649.

**Mozhaev, V. V.**, Heremans, K., Frank, J., Masson, P., Balny S., *Proteins*, **1996**, 24, 81–91.

**Mozhaev, V.V.**, Heremans, K., Frank, J., Masson, P., Balny, C., **1994**, *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 34, 191–194.

## N

**Nakamura, K.**, Min Chi, Y., Yamada, Y. e Yano, T., *Chem.Eng. Commun.*, **1986**, 45, 207–212.

**Najdanovic–Visak, V.**, Serbanovic, A., Esperança, J. M. S. S., Guedes, H. J. R., Rebelo, L. P. N, da Ponte M. N., *Chem. Phys. Chem.*, **2003**, 4, 520–522.

**Noël, M.**, Lozano, P., Vaultier, M., Iborra, J. L., *Biotechnol. Lett.*, **2004**, 26, 301–306,.

## O

**Öhrner, N.**, Orrenius, C., Mattson, A., dahlén, E., Norin, T., Hult, K., *Enzyme Microb. Tech.*, **1996**, 19, 328–331.

**Orrenius, C.**, Häffner, F., Rotticci, D., Öhrner, N., Norin, T. and. Hult, K., *Biocatal. Biotransfor.*, **1998**, 16, 1–15.

**Ottosson, J.**, Fransson, L., Hult, K., *Protein Sci*, **2002**, 11, 1462–1471.

**Ottosson, J.**, Rotticci-Mulder, J. C., Rotticci, D., Hult, K., *Protein Sci.*, **2001**, 10, 1769–1774.

**Overbeeke, A. P. L.**, Jongejan, J. A., Heijnen, J. J., *Biotechnol. Bioeng.*, **2000**, 70, 3, 278–290.

**Özotop, H.N.**, Özotop, A.Y., Karadag, E., Isikver, Y., Saraydin, D., *Enzyme. Microb. Tech.*, **2003**, 32, 114–119.

## P

**Palomo, J.M.**, Fernandez–Lorente,G., Mateo, C., Ortiz,C., Fernandez–Lafuente, R., Guisan, J., *Enzym. Microb. Tech.*, **2002**, 31, 775–783.

**Pandey, A.**, Benjamin, S., Soccol, C. R., Nigan, P., Krieger, N., Soccol, V.T., *Biotechnol. Appl. Bioc.*, **1999**, 29, 119–131.

**Park S.**, Kazlauskas R. J., *J. Org. Chem.*, **2001**, 66, 8395–8401.

**Parker, M. C.**, Moore, B. D., Blacker, A. J., *Biotechnol. Bioeng.*, **1995**, 46, 452–458.

**Partridge, J.**, Halling, P.J., Moore, B.D., *J. Chem. Soc., Perk. T. 2*, **2000**, 465–471.

**Partridge, J.**, Dennison, P.R., Moore, B.D., Halling, P.J., **1998**, *Biochim. Biophys. Acta*, 138, 79–89.

**Pence, D. N.**, Gu, T., *Separations Technol.*, **1996**, 6, 261–264.

**Peres C.**, Harper, N., Gomes da Silva, M. D. R., Barreiros, S., *Enzyme. Microb. Tech.*, **2005**, 37, 145–149.

**Peres C.**, Gomes da Silva, M. D. R., Barreiros, S., *J. Agri. Food Chem.*, **2003**, 51, 1884–1888.

**Pham, V. T., Phillips, R. S.,** *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 3629–3632.

**Pham, V. T., Phillips, R. S., Ljungdahl, L. G.,** *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, 111, 1935–1936.

**Phillips, R. S.,** *Trends Biotechnol.*, **1996**, 13–16.

**Poliakoff, M., Fitzpatrick, J.M., Farren, T. R., Anastas, P. T.,** *Science*, **2002**, 297, 807–810.

**Price, N.C., Dwek, R.A., Ratcliffe, R.G., Wormald, M.R.** *Principles and Problems in Physical Chemistry for Biochemists*, 3<sup>rd</sup> ed., Oxford University Press, **2001**.

## R

**Randolph, T.W., Clark D.S., Blanch, H. W., Prausnitz, J. M.,** *P. Natl. Acad. Sci. USA.*, **1988**, 85, 2979–2983.

**Randolph, T. W., Blanch, H. W., Prausnitz, J. M., Wilke, C. R.,** *Biotechnol. Lett.*, **1985**, 7, 325–328.

**Rantwijk V. F., Lau R. M., Sheldon R. A.,** *Trends Biotechnol.*, **2003**, 21, 131–138.

**Reslow, M., Aldlercreutz, P., Mattiasson, B.,** *Eur. J. Biochem*, **1988**, 172, 573–578.

**Reetz ,M. T.,** *PNAS*, **2004**, 101,16, 5716–5722.

**Reetz ,M. T., Wiesenhöfer, W., Franciò, G., Leitner, W.,** *Adv. Synth.Catal.*, **2003**, 345, 1221–1228.

**Reetz, M. T., Wiesenhöfer, W., Franciò, G., Leitner, W.,** *Chem.Comm.*, **2002**, 992–993.

**Reid, R.C., Prausnitz, J. M., Poling, B. E.,** *The properties of gases and liquids*, **1987**, 4th edition McGraw-Hill, New York.

**Ribeiro, R. F., Alvarez, F., Henriques,C., Lemos, F., Lopes J.M., Ribeiro, M.F.,** *J. Mol. Catal. A–Chem.*, **1995**, 96, 245 –270.

**Rotticci, D., Ottosson, J., Norin, T, Hult, K.,** *Enzymes in Nonaqueous solvents Methods and Protocols*, ed Halling, P.J., e Holland, H.L Vulfson, E.N, **2001**, vol.15, 22, 261–276.

**Ryu, K., Dordick, J.S.,** *Biochemistry–US.* **1992**, 31, 2588–2598.

**Ruivo R., Paiva, A., Simões P.,** *J. Supercritical Fluid*, **2004**, 29, 77–85.

**Rupley, J.A., Careri, G.,** *Adv. Protein. Chem.*, **1991**, 41, 37–172.

**Rupley, J.A., Gratton, E., Careri, G.,** *Trends Biochem. Sci.*, **1983**, 8, 18–22.

**S**

- Sakai, T.**, Mitsutomi, H., Korenaga, T., Ema, T., *Tetrahedron–Asymmetr.*, **2005**, 16, 1535–1539.
- Sakai, T.**, *Tetrahedron–Asymmetr.*, **2004**, 15, 2749–2756.
- Sakai, T.**, Hayashi, K., Yano, F., Takami, M., Ino, M., Korenaga, T., Ema, T., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **2003 a**, 76, 1441–1446.
- Sakai, T.**, Matsuda, A., Korenaga, T., Ema, T., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **2003 b** 76, 1819–1821.
- Sakai, T.**, Kawabata, I., Kishimoto, T., Ema, T., Utakat, M., *J. Org. Chem.*, **1997**, 62, 4906–4907.
- Salunkhe, M. M., Nair, R.**, *J. Mol. Catal. B – Enzym.* **2000**, 10, 535–538.
- Sandoval, G.**, Condoret, J.S., Monsan, P., Marty, A., *Biotechnol. Bioeng.*, **2002**, 78, 313–320.
- Sarrade S.**, Guizard, C., Rios, G.M., *Separation and Purification Technology*, **2003**, 32, 57–63.
- Sazonov, V. P., Shaw, D.G.**, *J. Phys. Chem. Ref. Data*, **2002**, 31, 4, 989–1131.
- Schmid, A.**, Hollmann, F., Park, J. B., Bühler, B., *Curr. Opin. Biotech.*, **2002**, 13, 359–366.
- Schmitke, J. L.**, Stern, L. J., Klivanov, A. M., *Biochem. Bioph. Res. Co.*, **1998**, 273–277.
- Schmitke, J. L.**, Stern, L. J., Klivanov, A. M., *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **1997**, 94, 4250–4255.
- Schmitke, J. L.**, Wescott, C. R., Klivanov, A. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 3360–3365.
- Schnell, B.**, Faber, K., Kroutil, W., *Adv. Synth. Catal.*, **2003**, 345, 653–666.
- Schoemaker, H. E.**, Mink D., Wubbolts M.G., *Science*, **2003**, 299, 1694–1697.
- Schöfer, S. H.**, Kaftzik, N., Wasserscheid P., Kragl, U., *Chem. Commun.*, **2001**, 425–426.
- Scurto, A. M.**, Aki, S. N. V. K., J. F. Brennecke, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 10726–10727
- Secundo, F.**, Spadaro, S., Carrea, G., Overbeeke, A. P. L., *Biotechnol. Bioeng.*, **1999**, 62, 554–5561.
- Secundo, F.**, Riva S., Carrea, G., *Tetrahedron–Asymmetr.*, **1992**, 3, 262–280.
- Seddon, K. R.**, *Kinet. Catal.*, **1996**, 37, 693–697.
- Sereti, V.**, Stamatis, H., Kolisis, F. N., *Biotechnol. Tech.*, **1997**, 11, 661–665.

**Serralha F. N.**, Lopes, J. M, Lemos, F., Prazeres, D. M. F., Aires–Barros, M. R., Cabral, J. M. S., Ribeiro, F. R., *J. Mol. Catal. B – Enzym.*, **2001**, 11, 713–118.

**Serralha, F. N.**, Lopes, J. M., Lemos, F., Prazeres, D. M. F., Aires–Barros, M. R., Cabral, J. M. S., Ribeiro, F. R., *J. Mol. Catal. B – Enzym.*, **1998**, 4, 303–311.

**Sheldon R. A.**, *Green Chem.*, **2005**, 7, 267–278

**Sheldon, R. A.**, Lau, R. M., Sorgedragar, M. J., Rantwijk, Van, F., Seddon, K. R., *Green Chem.*, **2002**, 4, 147–151.

**Simões, P.**, Carmelo, P.J., Pereira P.J, Lopes, J.A., da Ponte M.N., Brunner, G., *J.Supercritical Fluid.*, **1998**, 13, 337–341.

**Soares, C. M.**, Teixeira, V. H., Baptista, A. M., *Biophys. J.* , **2003**, 84, 1–14.

**Sorensen, J.M.**, Magnussen, T., Rasmussen, P., Fredenslund, A., *Fluid Phase Equilibr.*, **1979**, 3, 1, 47–82.

**St Clair N.L., Navia, M. A.**, *J.Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 7314–7316.

**Straathof, A. J. J., Jongejan, J. A.**, *Enzyme Microb. Tech.*, **1997**, 21, 559–571.

## T

**Terefe, N. S.**, Arimi, J. M., Loey, A. V., Hendrickx, M., *Biotechnol. Prog.*, **2004**, 20, 1467–1478.

**Theppakorn, T.**, Kanasawud, P., Halling, P.J., *Enzyme Microb. Tech.*, **2003**, 32, 828–836.

**Toba, S.**, Hartsough, D.S., Merz, K.M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 6490–6498.

**Tokuda, H.**, Hayamizu, K., Ishii, K., Hasan Susan, Md. A. B., Watanabe, M., *J. Phys. Chem. B*, **2004**, 108, 16593–16600.

**Turner, N. A.**, Needs, E. C., Khan, J. A., Vulfson, E. N., *Biotechnol. Bioeng.*, **2001**;72, 1, 108 –118.

**Turner, N.A., Vulfson, E. N.**, *Enzyme Microb. Tech.*, **2000**, 27, 108–113.

**Turner, N. J.**, *Trends Biotechnol.*, **2003**, 21, 11 474–478.

## U

**Uppenberg, J.**, Hansen, M.T., Patkar, S. Jones, T.A., *Structure*, **1994**,2, 293–808.

## V

- Valivety, R.H.**, Halling, P.J., Peilow, A.D., Macrae, A.R., *Eur J. Biochem.*, **1994**, 222, 461–466.
- Valivety R.H.**, Halling, P.J., Peilow, A.D., Macrae, A.R., *Biochim Biophys Acta*, **1992 a**, 1122, 143–146.
- Valivety R.H.**, Halling, P.J., Peilow, A.D., Macrae, A.R., *Biochim Biophys Acta*, **1992 b**, 1118, 218–222.
- Van Unem, D.J.**, Engbersen J.F.J., Reinhout D.N., *Biotechnol. Bioeng.*, **2001**, 75, 154–158.
- Vázquez Lima, F.**, Pyle, D.L., Asenjo, J.A., *Biotechnol. Bioeng.*, **1995**, 46, 69–97.
- Vidinha, P.**, Augusto, V., Almeida M., Fonseca, I., Fidalgo, A., Ilharco, L., Cabral, J. M. S. E Barreiros, S., *J. of Biotechnol.*, **2005**, em impressão (disponível em [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)).
- Vidinha P.**, Harper N., Micaelo N. M., Lourenço N. M. T., Gomes da Silva M. D. R., Cabral J. M. S., Afonso, C. A. M e Barreiros S., *Biotechnol. Bioeng.*, **2004**, 85, 442–449.
- Villeneuve, P.**, Muderhwa, J. M., Graille J., Haas, M. J., *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, **2000**, 9, 113–148.

## W

- Warshel, A.**, Naray-Szabo, G., Sussman, F., Hwang, J.-K., *Biochemistry*, **1989**, 28, 9, 3629–3637.
- Webb, P. B.**, Sellin, M. F., Kunene, T. E., Williamson, S., Slawinand, A., Cole–Hamilton M. Z. D. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 15577–15588.
- Wehtje, E.**, Kaur, J., Adlercreutz, P., Chand, S., Mattiasson B., *Enzyme Microb Technol*, **1997**, 21, 502–510.
- Wegman, M.A.**, Hacking M.A.P.J., Rops, J., Pereira P., Rantwijk F. e Sheldon R.A. Rantwijk, *Tetrahedron–Asymmetr.*, **1999**, 10, 1739–1750.
- Weik, M.**, *Eur. Phys. J. E*, **2003**, 12, 153–158.
- Weitkamp, J.**, *Solid State Ionics*, **2000**, 131, 175–188.
- Wescott, C. R.**, Noritomi, H., Klivanov, A. M., *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 10365–10370.
- Wilkes, J. S.**, *Green Chem.*, **2002**, 4, 73–80.
- Wilkes J.S.**, Zaworotko, M.J., *J. Chem. Soc. Commum*, **1992**, 13, 965–967.

**X**

**Xu, K.**, Klibanov, A.M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 9815–9819.

**Y**

**Yennawar, N.H.**, Yennawar, H.P., Farber, G.K., *Biochemistry–US*, **1994**, 33, 7326–7337.

**Z**

**Zacharis, E.**, Moore, B.D., Halling, P.J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 12396–12397.

**Zaks, A., Klinanov, A.M.**, *J. Biol. Chem.*, **1988**, 263, 17, 8017–8021.

**Zaks, A., Klinanov, A.M.**, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **1985**, 82, 3192–3196.

**Zaks, A., Klibanov, A. M.**, *Science*, **1984**, 224, 1249–1251.